



**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**  
**INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PLANTAS  
DO CERRADO BRASILEIRO SOBRE ESPIROQUETAS DO  
COMPLEXO *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.)**

**MARISA PEREIRA LOPES**

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS  
BIOMÉDICAS, ESPECIALIDADE EM BIOLOGIA MOLECULAR E SAÚDE TROPICAL E  
INTERNACIONAL**

**FEVEREIRO, 2017**



**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

**INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL**

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PLANTAS DO  
CERRADO BRASILEIRO SOBRE ESPIROQUETAS DO COMPLEXO *Borrelia*  
*burgdorferi* sensu lato (s.l.)

**Autor:** MARISA PEREIRA LOPES

**Orientadora:** Investigadora Doutora Maria Luísa Jorge Vieira, Unidade de Ensino e Investigação (UEI) de Microbiologia Médica, responsável do Grupo de Leptospirose e Borreliose de Lyme (GLBL), Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), da Universidade Nova de Lisboa (UNL), Lisboa, Portugal

**Co-orientadora:** Professora Doutora Yanna Karla de Medeiros Nóbrega, Laboratório de Pesquisa em Doenças Imunogenéticas e Crónico-degenerativas, Faculdade de Ciências para a Saúde e Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas, especialidade em Biologia Molecular e Saúde Tropical e Internacional

## **Apresentações em Reuniões Científicas**

Parte dos resultados incluídos no presente trabalho, desenvolvido durante a elaboração desta Dissertação de Mestrado, foram parcialmente apresentados, sob a forma de comunicação oral, na seguinte reunião científica:

**Marisa Lopes**, Teresa Carreira, Mónica Nunes, Yanna Nobrega, Maria Luísa Vieira (2016). “**A Borreliose de Lyme e os novos desafios terapêuticos**”. Comunicação oral na 2ª edição do Workshop NOVA Saúde, organizado pela Universidade Nova de Lisboa (UNL) e o Instituto Nacional de Saúde Dr Ricardo Jorge (INSA) sob a temática “Doenças transmitidas por vetores” realizado no Instituto de Higiene e Medicina Tropical em 19 de outubro 2016.

## AGRADECIMENTOS

Ao terminar esta importante etapa do meu percurso acadêmico e científico, é de realçar a importância que algumas pessoas tiveram para a conclusão com sucesso deste desafio. Quero agradecer de coração:

À Inv.<sup>a</sup> Doutora Maria Luísa Vieira, orientadora desta Dissertação, a forma como tão bem me recebeu na sua equipa, a simpatia e principalmente toda a aprendizagem e sabedoria que me incutiu, algo que certamente levarei para a vida. É de destacar a sua orientação e acompanhamento durante o trabalho, algo que foi muito importante para a sua conclusão.

À Prof.<sup>a</sup> Doutora Yanna Nóbrega da Universidade de Brasília, co-orientadora da presente Dissertação, toda a ajuda prestada e todos os ensinamentos, que mesmo com o Oceano Atlântico entre nós nunca falharam. Sem esquecer uma outra sua ajuda preciosa, a disponibilização dos extratos de plantas do Cerrado Brasileiro, sem os quais não teria sido possível realizar esta investigação.

À querida tutora Mestre Teresa Carreira, que me acompanhou na bancada durante todo o trabalho, a simpatia, amizade e toda a ajuda. Certamente foi um pilar muito importante, sem o qual este trabalho não teria sido possível.

À Doutora Mónica Nunes, pela simpatia, boa disposição e amizade que sempre me ofereceu ao longo deste percurso.

À Mestre Catarina Alves pela cedência das câmaras de anaerobiose, pois sem elas não seria possível realizar o trabalho.

Aos meus queridos pais e irmão, por todo o apoio, amor, amizade, bons valores que sempre me transmitiram e por sempre me incentivarem a lutar pelos meus sonhos.

Ao meu querido namorado João, por todo o carinho, paciência e incentivo durante este longo ano.

Às minhas queridas amigas Mariana Carrusca e Filipa Silva, por todo o companheirismo, amizade e paciência durante toda esta aventura.

Por ultimo, a todas as pessoas, amigos e familiares que fazem parte da minha vida e que contribuíram para a conclusão desta etapa.

## RESUMO

A Borreliose de Lyme (BL) é uma doença infecciosa e multissistêmica causada por bactérias (espiroquetas) do complexo *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* s.l.), transmitidas por vetores (carraças), sobretudo da espécie *Ixodes ricinus*, no continente Europeu. A doença apresenta uma distribuição mundial, sendo mais prevalente nos Estados Unidos da América e na Europa. Em Portugal, é considerada uma doença de declaração obrigatória (DDO), desde 1999. A doença pode afetar diferentes órgãos e sistemas, dependendo da espécie infetante, uma vez que cada uma possui um tropismo diferente, podendo causar desde manifestações cutâneas a complicações neurológicas. Para o seu tratamento são usados antimicrobianos como a doxiciclina, amoxicilina e ceftriaxona. No entanto, têm vindo a ser investigados novos compostos baseados em extratos de plantas, como alternativa terapêutica, de forma a reduzir os efeitos nefastos que podem advir da utilização a longo prazo destes antimicrobianos. O Brasil é conhecido por possuir uma riquíssima biodiversidade, cujos compostos bioativos oriundos da sua flora, têm sido utilizados no tratamento de diversas doenças.

Assim, o principal objetivo deste trabalho foi investigar a atividade antimicrobiana de extratos brutos de plantas provenientes do Cerrado Brasileiro contra estirpes de espécies de referência do complexo *B. burgdorferi* s.l..

Foi avaliada a concentração inibitória mínima (MIC) de quatro extratos brutos (etanólicos e aquosos) das espécies *Eugenia dysenterica* e *Pouteria ramiflora* face a estirpes de *Borrelia* das espécies *B. burgdorferi* sensu stricto (s.s.), *B. garinii*, *B. bavariensis* e *B. afzelii*, usando o método de microdiluição em placa descrito na norma M27-A2 do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI), com algumas modificações.

Os extratos testados apresentaram um comportamento semelhante com as estirpes em estudo, sendo eficazes contra as mesmas. Quando comparados os extratos etanólicos e aquosos, os primeiros mostraram possuir maior eficácia, uma vez que, apresentaram valores de MIC de 312,5 a 2500 µg/mL enquanto os extratos aquosos apresentaram valores entre 2500 a 10000 µg/mL. O extrato etanólico de *Eugenia dysenterica* mostrou possuir uma melhor eficácia contra todas as espécies utilizadas do complexo *B. burgdorferi* s.l..

Os compostos bioativos presentes nos extratos brutos estudados demonstraram possuir atividade antimicrobiana, pelo que os resultados obtidos, embora preliminares, são promissores para o futuro isolamento de novas moléculas bioativas que poderão ser usadas no tratamento da BL.

**Palavras-chave:** *Borrelia*, extratos, MIC, compostos bioativos.

## ABSTRACT

Lyme Borreliosis (LB) is a multisystemic and infectious disease caused by bacteria (spirochetes) belonging to *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* s.l.) complex, that are transmitted by vectors (ticks), mainly *Ixodes ricinus* species, in European continent. The disease has a worldwide distribution, being more prevalent in the United States of America and Europe. In Portugal is considered a notifiable disease since 1999. The disease can affect multiples organs and systems, depending on the infecting species, since each has a different tropism and can range from skin manifestations to neurological complications. Treatment is conducted using antimicrobials such as doxycycline, amoxicillin and ceftriaxone. However, novel compounds based on plant extracts have been investigated, as an alternative therapy in order to reduce the adverse effects which may result from long term use of these antimicrobials. Brazil is known to have a rich biodiversity, which derived bioactive compounds of its flora have been used in the treatment of a wide range of diseases.

So, the aim of this study was to investigate the antimicrobial activity of plant crude extracts from the Brazilian Cerrado against strains of the reference species of *B. burgdorferi* s.l. complex.

The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of four crude extracts (ethanolic and aqueous) belonging to the species *Eugenia dysenterica* and *Pouteria ramiflora* against strains of diverse *Borrelia* species, such as *B. burgdorferi* sensu stricto (s.s.), *B. garinii*, *B. bavariensis* and *B. afzelii*, was evaluated using the microdilution method of the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), with some modifications.

The extracts tested showed a similar behavior with the studied strains under study, being effective against them. When comparing the ethanolic and aqueous extracts, the first showed to possess higher efficacy, once MIC values ranged from 312.5 to 2500 µg/mL, while the aqueous extracts exhibited values between 2500 to 10,000 µg/mL. From all the tested ethanolic extract of *Eugenia dysenterica* species revealed a better efficacy against all species of *B. burgdorferi* s.l. complex.

The bioactive compounds present in crude extracts tested, showed to possess antimicrobial activity, consequently, the results obtained although preliminary are promising for the future isolation of new bioactive molecules which can be used in LB treatment.

**Keywords:** *Borrelia*, extracts, MIC, bioactive compounds

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACA – Acrodermatite Crónica Atrófica

ATCC – *American Type Culture Collection*

*B. burgdorferi* s.l. – *Borrelia burgdorferi* sensu lato

*B. burgdorferi* s.s. – *Borrelia burgdorferi* sensu stricto

BL – Borreliose de Lyme

BSK – *Barbour – Stoenner – Kelly*

CDC – *Center for Disease Control and Prevention*

CN – Controlo Negativo

CP – Controlo Positivo

DDO – Doença de Declaração Obrigatória

DL – Doença de Lyme

EDY1- Extrato aquoso de *Eugenia dysenterica* (designação codificada do extrato)

EDY2 - Extrato etanólico de *Eugenia dysenterica* (designação codificada do extrato)

ELISA – *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*

EM – Eritema *migrans* (=eritema migrante)

EUA – Estados Unidos da América

EUCALB – *European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis*

FR – Febre Recorrente

GLBL – Grupo Leptospirose e Borreliose de Lyme

IFI – Imunofluorescência Indireta

Ig – Imunoglobulina

IHMT – Instituto de Higiene e Medicina Tropical

LCR – Líquido Cefalo-Raquidiano

MBC – *Minimal Bactericidal Concentration*

MIC – *Minimal Inhibitory Concentration*

MKP – *Medium Kelly-Pettenkofer*

OMS – Organização Mundial da Saúde

ND – Não definido

NDt – Não detetável

Osp – *Outer surface protein*

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase)

PR1 - Extrato aquoso de *Pouteria ramiflora* (designação codificada do extrato)

PR3 - Extrato etanólico de *Pouteria ramiflora* (designação codificada do extrato)

UEI – Unidade de Ensino e Investigação

UNL – Universidade Nova de Lisboa

WB – *Western Blot*

## **Unidades de medida**

µg – micrograma

mg – miligrama

µL - microlitro

mL – mililitro

Mio – *million units* (“milhões de unidades”)

nm - nanómetro



## ÍNDICE GERAL

RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABELAS.....	xi

### I - INTRODUÇÃO

1 – JUSTIFICAÇÃO DO TEMA E OBJETIVOS .....	2
2 – CONTEXTO HISTÓRICO DA DOENÇA.....	3
3 – CARACTERÍSTICAS DO AGENTE ETIOLÓGICO.....	5
3.1 – MORFOLOGIA.....	5
3.2 – TAXONOMIA E CLASSIFICAÇÃO.....	7
4 – EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA.....	9
4.1 – VETOR.....	9
4.2 – HOSPEDEIROS.....	10
4.3 – TRANSMISSÃO.....	11
5 – MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	12
6 – DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL.....	16
7 – DIAGNÓSTICO DA DOENÇA.....	17
7.1 – DIAGNÓSTICO CLÍNICO.....	17
7.2 – DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	18
8 – ABORDAGENS TERAPÊUTICAS.....	21
8.1 – ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS.....	21
8.2 – PRODUTOS NATURAIS.....	22
9 – NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS.....	23
9.1 – PLANTAS MEDICINAIS.....	23
9.2 – PLANTAS DO CERRADO BRASILEIRO.....	24
9.3 – ESPÉCIE <i>Eugenia dysenterica</i> MART.DC.....	26
9.3.1 – Taxonomia, Classificação e Características.....	26
9.3.2 – Utilizações .....	27
9.3.3 – Utilizações Terapêuticas .....	28

9.4 – ESPÉCIE <i>Pouteria ramiflora</i> MART. RADLK.....	28
9.4.1 - Taxonomia, Classificação e Características .....	28
9.4.2 – Utilizações .....	30
9.3.3 – Utilizações Terapêuticas .....	30
 <b>II – MATERIAL E MÉTODOS</b>	
<b>1 – CULTURAS DE REFERÊNCIA DE ESPÉCIES DO COMPLEXO</b>	
<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l .....	32
1.1 – MANUTENÇÃO DAS CULTURAS .....	33
<b>2 – IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA E EXTRATOS VEGETAIS .....</b>	
2.1 – OBTENÇÃO E CARACTERÍSTICAS DOS EXTRATOS VEGETAIS .....	34
<b>3 – ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS <i>in vitro</i> .....</b>	
3.1 – PREPARAÇÃO DA CULTURA.....	36
3.2 – PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS.....	36
3.3 – TESTE DE SUSCETIBILIDADE POR MICRODILUIÇÃO.....	37
4 – DETERMINAÇÃO DE MIC.....	38
5 – DETERMINAÇÃO DE MBC.....	39
6 – TRATAMENTO DE DADOS.....	40
6.1 – DETERMINAÇÃO DE MIC <sub>50</sub> E MIC <sub>90</sub> .....	40
7 – ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
 <b>III – RESULTADOS</b>	
1 – OBSERVAÇÃO DAS MICROPLACAS .....	43
2 – COMPARAÇÃO ENTRE VALORES DE MIC, MIC <sub>50</sub> E MIC <sub>90</sub> , VIABILIDADE A 10% E 50% E MBC.....	44
3 – COMPARAÇÃO ENTRE EXTRATOS E ESPÉCIES ESTUDADOS.....	48
 <b>IV – DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....</b>	 54
<b>V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>61</b>
<b>VI – ANEXOS.....</b>	<b>71</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Observação de carraças pelo Dr. William Burgdorfer.....	4
Figura 2.	Microfotografia de <i>Borrelia burgdorferi</i> .....	4
Figura 3.	Morfologia da espiroqueta <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. ....	5
Figura 4.	Representação esquemática da estrutura e morfologia de espiroquetas do género <i>Borrelia</i> . Observam-se os pontos de inserção flagelar localizados na zona terminal da espiroqueta e os flagelos inseridos na membrana citoplasmática atravessando a parede celular para o espaço periplasmático...	6
Figura 5.	Representação esquemática da taxonomia da Ordem Spirochaetales .....	8
Figura 6.	Representação da distribuição mundial dos principais vectores da Borreliose de Lyme .....	9
Figura 7.	Representação gráfica de três estados do ciclo de vida das carraças. Da esquerda para a direita: larva, ninfa, fêmea adulta e macho adulto .....	10
Figura 8.	Representação do ciclo enzoonótico de transmissão de borrelíias do complexo <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l .....	11
Figura 9.	Imagens ilustrativas de EM.....	13
Figura 10.	Imagem ilustrativa de Paralisia facial .....	14
Figura 11.	Linfocitoma borreliano na aréola esquerda .....	15
Figura 12.	Linfocitoma borreliano no lóbulo da orelha .....	15
Figura 13.	Representação de casos de pacientes com ACA (A, B, C) .....	16
Figura 14.	Representação da metodologia de duas abordagens para o diagnóstico de BL.....	20
Figura 15.	Mapa representativo do Brasil e respectivos Biomas .....	25
Figura 16.	Distribuição da vegetação do Cerrado Brasileiro.....	25
Figura 17.	Árvore da espécie <i>Eugenia dysenterica</i> .....	27
Figura 18.	Árvore de <i>Pouteria ramiflora</i> .....	29

Figura 19.	Culturas de estirpes das diferentes espécies <i>B. burgdorferi</i> sensu lato em crescimento, a 34° C .....	32
Figura 20.	Alteração da cor do meio BSK. Coloração amarela evidencia crescimento de borrélias; coloração vermelha evidencia cultura ainda em crescimento ....	33
Figura 21.	Microfotografia representativa de uma cultura de espiroquetas de <i>B. burgdorferi</i> .s.l., observando-se a forma espiralada das mesmas (400×).....	36
Figura 22.	Representação esquemática da microplaca.....	38
Figura 23.	Representação da câmara de Petroff-Hausser counter-3900 .....	39
Figura 24.	Visualização e contagem de borrélias em microscopia de fundo escuro .....	39
Figura 25.	Representação dos tubos de borrélias re-cultivadas com extrato, no final da incubação de 21 dias .....	40
Figura 26.	Representação do teste de suscetibilidade em microplaca.....	43
Figura 27.	Representação gráfica da comparação dos valores de MIC correspondentes à estirpe B31 de <i>B. burgdorferi</i> s.s. contra os extratos EDY1, EDY2, PR1 e PR2 em relação à MIC do controlo positivo (doxiciclina).....	49
Figura 28.	Representação da comparação dos valores de MIC correspondentes à estirpe Pbi Japão de <i>B. garinii</i> contra os extratos EDY1, EDY2, PR1 e PR2 em relação à MIC do controlo positivo (doxiciclina).....	50
Figura 29.	Representação da comparação dos valores de MIC correspondentes à estirpe Pbi de <i>B. bavariensis</i> contra os extratos EDY1, EDY2, PR1 e PR2 em relação à MIC do controlo positivo (doxiciclina).....	51
Figura 30.	Representação da comparação dos valores de MIC correspondentes à estirpe de <i>B. afzelii</i> contra os extratos EDY1, EDY2, PR1 e PR2 em relação à MIC do controlo positivo (doxiciclina).....	52

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.	ATCC® correspondentes às espécies do complexo <i>B. burgdorferi</i> s.l. utilizadas neste estudo.....	32
Tabela 2.	Espécie, Família e <i>Voucher</i> das Plantas utilizadas para os extratos.....	34
Tabela 3.	Identificação e características dos extratos a utilizar neste estudo.....	35
Tabela 4.	Valores de MIC para os quatro (4) extratos testados para as estirpes de <i>B.b.s.l.</i> .....	44
Tabela 5.	Valores de MIC <sub>50</sub> e MIC <sub>90</sub> dos quatro (4) extratos testados para as estirpes do complexo <i>B. burgdorferi</i> s.l.....	45
Tabela 6.	Concentração de extrato necessária para eliminar 50% e 90% da população de borrélias estudadas ( <i>B. burgdorferi</i> s.s. e <i>B. garinii</i> ).....	46
Tabela 7.	Concentração de extrato necessária para eliminar 50% e 90% da população de borrélias estudadas ( <i>B. bavariensis</i> e <i>B. afzelii</i> ).....	47
Tabela 8.	Valores de MBC dos quatro (4) extratos testados para as estirpes do complexo <i>burgdorferi</i> s.l. ....	48
Tabela 9.	Valores de MIC correspondentes da doxíciclina sobre as espécies de <i>B. burgdorferi</i> s.l. ....	48

## **I - INTRODUÇÃO**

# I – INTRODUÇÃO

## 1 – JUSTIFICAÇÃO DO TEMA E OBJETIVOS

A Doença de Lyme (DL) ou Borreliose de Lyme (BL) é causada por espiroquetas pertencentes ao complexo *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* s.l.), transmitidas por vetores, carrapatos pertencentes ao género *Ixodes*. A doença possui uma distribuição mundial e evidencia uma maior prevalência nos Estados Unidos da América e na Europa. Em Portugal a DL foi considerada uma Doença de Declaração Obrigatória (DDO) em 1999.

O diagnóstico da DL é fundamentalmente clínico, no entanto algumas manifestações clínicas são partilhadas por outras doenças e por isso é necessário recorrer ao diagnóstico laboratorial para apoiar a decisão clínica.

A terapêutica para a DL baseia-se em antimicrobianos, recomendados consoante a evolução da doença (recente ou tardia). Os antimicrobianos mais utilizados são doxiciclina, amoxicilina, ceftriaxona. Porém, e como seria de esperar nem todos os doentes respondem de igual forma aos antimicrobianos recomendados. É do conhecimento popular que alguns medicamentos utilizados no tratamento de algumas doenças, advêm de produtos naturais. A utilização de plantas na criação de novos fármacos é assim uma prática muito comum em diversos países.

O Brasil é conhecido pela sua rica biodiversidade, incluindo uma vasta gama de plantas, utilizadas pela população para fins medicinais. As plantas têm revelado ser uma ótima fonte de compostos bioativos.

O objetivo deste trabalho foi determinar a atividade antimicrobiana de extratos brutos vegetais provenientes da região do Cerrado brasileiro, em culturas de referência de várias espécies do complexo *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* s.l.), nomeadamente *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (*B. burgdorferi* s.s.), *B. garinii*, *B. afzelii* e *B. bavariensis*.

Para a execução do referido objetivo foi proposto a realização de um teste de sensibilidade por microdiluição, o qual permite determinar a Concentração Inibitória Mínima [Minimal Inhibitory Concentration (MIC)] e ainda a Concentração Microbicida Mínima (Minimal Bactericidal Concentration (MBC) para cada um dos extratos contra cada espécie em estudo. Foi também proposto a determinação da concentração inibitória mínima para 50% e 90% das estirpes em estudo ( $MIC_{50}$  e  $MIC_{90}$ ), bem como, a determinação de 10% e 50% de borrélias viáveis, através da contagem de espiroquetas com motilidade.

## 2 – CONTEXTO HISTÓRICO DA DOENÇA

A doença de Lyme foi conhecida pela primeira vez em 1975, na sequência de um surto de aparente artrite juvenil em crianças da cidade de Lyme e duas outras cidades vizinhas, pertencentes ao estado de Connecticut, Estados Unidos da América (EUA) (Steere *et al.*, 1983).

Após alguns estudos os investigadores responsáveis pensaram em diversas causas possíveis para aquele surto repentino, como o contacto com micróbios na água ou no ar. No entanto, o facto de os primeiros sintomas começarem a surgir durante o Verão, e a maioria dos doentes apresentar erupção cutânea e muitos desses casos exibirem mordedura de carraça no local da erupção, levou a que rapidamente os investigadores tivessem passado o seu foco e atenção para as carraças, admitindo que pudessem ser aquelas as responsáveis pela doença. A partir daquela altura, os investigadores começaram a descrever os sinais e sintomas desta nova doença, denominada então, por doença de Lyme (NIAID, 2008; 2015).

Na mesma época, nos Laboratórios Rocky Mountain, em Hamilton, Montana, o zoólogo e microbiólogo William Burgdorfer em colaboração com o Dr. Jorge Benach do Departamento de Saúde de Nova York tentavam solucionar a causa de um surto de febre ocorrido em Nova York entre 1971-1976 (NIAID, 2008).

No Verão de 1977, o Dr. Burgdorfer foi contactado pelo Dr. Allen C. Steere (médico reumatologista envolvido no surto de artrite na cidade de Lyme). Foi nessa altura que o



Dr. Steere alertou o Dr. Burgdorfer para a carraça do veado como o possível vetor responsável pela transmissão dos agentes da doença de Lyme. Um ano depois, o Dr. Burgdorfer visualizou movimento entre as células e os tecidos de seis carraças (Figura 1) (NIAID, 2008).



**Figura 1 - Observação de carraças pelo Dr. William Burgdorfer (NIAID, 2008).**

Em 1982, seguindo a origem dos movimentos anteriormente descritos, foram visualizados microrganismos enrolados em espiral e longos, idênticos a espiroquetas (Figura 2). Foi com esta descoberta que o Dr. Burgdorfer isolou, pela primeira vez, a bactéria responsável pela DL a partir da carraça do veado, da espécie *Ixodes dammini*, atual *Ixodes scapularis* (Steere *et al.*, 1983).

A descoberta feita pelo Dr. Burgdorfer, permitiu confirmar que soros de doentes de Lyme apresentavam anticorpos, reativos às espiroquetas encontradas nas carraças. Esta nova espiroqueta passa então a denominar-se *Borrelia burgdorferi*, em sua homenagem (Burgdorfer *et al.*, 1982).



**Figura 2 – Microfotografia de *Borrelia burgdorferi* (Adaptado de NIAID, 2008).**

Em Portugal, no distrito de Évora, em 1989, foi diagnosticado o primeiro caso clínico de Borreliose de Lyme pelo médico e investigador David de Moraes e colaboradores.

Em 1993, foi isolada a partir da carrapa *Ixodes ricinus* uma nova espiroqueta do complexo *Borrelia burgdorferi* s.l., designada por PoTi, que mais tarde haveria de ser conhecida como a espécie *Borrelia lusitaniae* (Franca *et al.*, 2005).

Algum tempo depois do isolamento de *Borrelia* obtido na carrapa foi, também, referida a seroprevalência da doença no sul do país (Collares-Pereira *et al.*, 2000) e em 2003, foi obtido o primeiro isolado humano de *B. lusitaniae*, a partir de lesões cutâneas de um doente, pela investigadora Margarida Collares-Pereira e colaboradores.

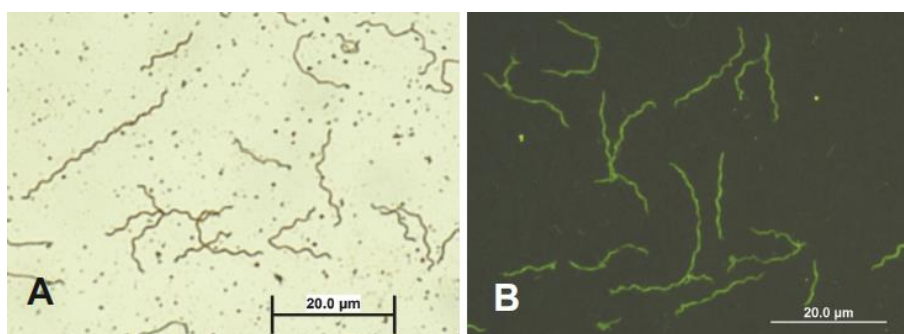
Em Portugal a Doença de Lyme é considerada de notificação obrigatória desde 1999 (Collares-Pereira *et al.*, 2004).

### 3 – CARATERÍSTICAS DO AGENTE ETIOLÓGICO

#### 3.1 – MORFOLOGIA

As Borrélias são microrganismos unicelulares, finos, alongados e muito móveis com morfologia helicoidal, não possuem parede celular rígida e têm um comprimento entre 10-30  $\mu\text{m}$  e um diâmetro entre 0,2 – 0,3  $\mu\text{m}$  (Barbour *et al.*, 1986; Krupka *et al.*, 2007).

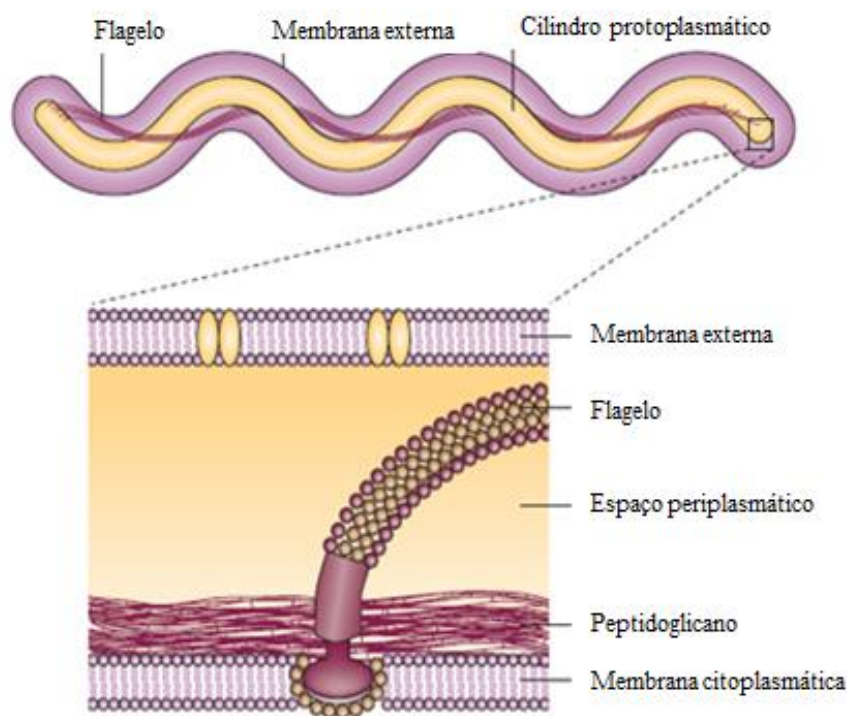
Estas bactérias reproduzem-se por fissão binária transversal e são anaeróbias ou microaerofílicas. Crescem sob uma temperatura de 34°C, quando cultivados em meios de cultura seletivos [ex: Barbour-Stonner-Kelly (BSK)] sendo apenas visíveis em microscopia de fundo escuro ou de contraste de fase. Quando presentes nos tecidos podem ser visualizadas a partir de colorações especiais (histoquímica ou imunohistoquímica), sendo as colorações argênticas (prata), as mais utilizadas (Figura 3) (Soares *et al.*, 2000).



**Figura 3 - Morfologia da espiroqueta *Borrelia burgdorferi* s.l.:** A – Coloração pela Prata; B- Imunofluorescência (Krupka *et al.*, 2007).

Estas bactérias exibem três tipos de movimento o que se deve ao facto de possuírem sete (7) - 14 flagelos localizados no espaço periplasmático entre a membrana celular externa e o cilindro protoplasmático. O flagelo é constituído por proteínas flagelares (flagelina) – FlaA *minor* (38KDa) e FlaB *major* (41KDa). Uma particularidade interessante acerca destas proteínas, é que efetuando um silenciamento, tendo como alvo o gene *flaB*, é induzida a perda de motilidade (Figura 4) (Krupka *et al.*, 2007).

No que respeita à constituição do envelope celular destas bactérias é bastante semelhante ao da maior parte das bactérias Gram negativo, embora apresente algumas diferenças, nomeadamente, a ausência de lipopolissacarídeos e a abundância de lipoproteínas na membrana celular externa (Krupka *et al.*, 2007).



**Figura 4 - Representação esquemática da estrutura e morfologia de espiroquetas do género *Borrelia*.** Observam-se os pontos de inserção flagelar localizados na zona terminal da espiroqueta e os flagelos inseridos na membrana citoplasmática atravessando a parede celular para o espaço periplasmático (Adaptado de Rosa *et al.*, 2005).

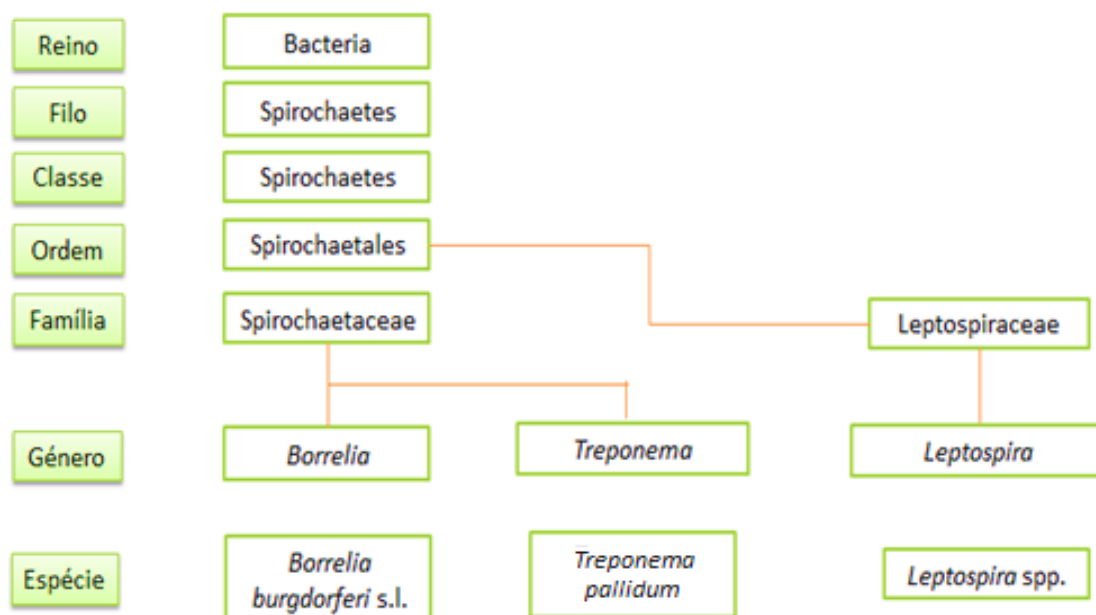
A membrana celular externa apresenta proteínas de superfície [*Outer Surface Protein* (Osp)] nomeadamente, OspA, OspB, OspC, OspD, OspE e OspF. Estas proteínas são importantes na manutenção da estrutura da membrana, e algumas têm um papel relevante em reações enzimáticas e no transporte de nutrientes através da membrana (Veinovic *et al.*, 2013).

As proteínas OspA e OspB são expressas pelas borrélias enquanto estas se encontram no vetor. A OspA é produzida quando a bactéria é transmitida à carraça a partir de um hospedeiro (mamífero) infectado, esta Osp possui propriedades de aderência ao intestino da carraça. A OspC por sua vez é a maior proteína expressa pela *B. burgdorferi* s.l. durante a transmissão desta, da carraça para o mamífero hospedeiro, quando as bactérias atingem as glândulas salivares da carraça (Pal *et al.*, 2004).

### 3.2 – TAXONOMIA E CLASSIFICAÇÃO

As borrélias do complexo *Borrelia burgdorferi* s.l. pertencem ao filo Spirochaetes, classe Spirochaetes e à ordem Spirochaetales, que inclui três famílias: Spirochaetaceae, Leptospiraceae e Brachyspiraceae (Karami, 2012).

A família Leptospiraceae inclui o género *Leptospira*, atualmente com 21 espécies conhecidas, responsáveis por uma outra doença zoonótica, a Leptospirose. A família Spirochaetaceae inclui o género *Borrelia* e o género *Treponema* ao qual pertence a espécie *Treponema pallidum*, agente causal da sífilis, doença sexualmente transmissível (Figura 5) (Karami, 2012).



**Figura 5** – Representação esquemática da taxonomia da Ordem Spirochaetales (esquema original da autora).

O género *Borrelia* atualmente é constituído por 44 espécies conhecidas (Franke *et al.*, 2013; Cutler, 2015; Ruzic-Sabljić *et al.*, 2016). As espécies de *Borrelia* conhecidas estão incluídas em três grandes grupos: grupo da Borreliose de Lyme (BL), Grupo da Febre Recorrente (FR) e ainda o grupo de borrelíias associado a répteis (REP) (Franke *et al.*, 2013).

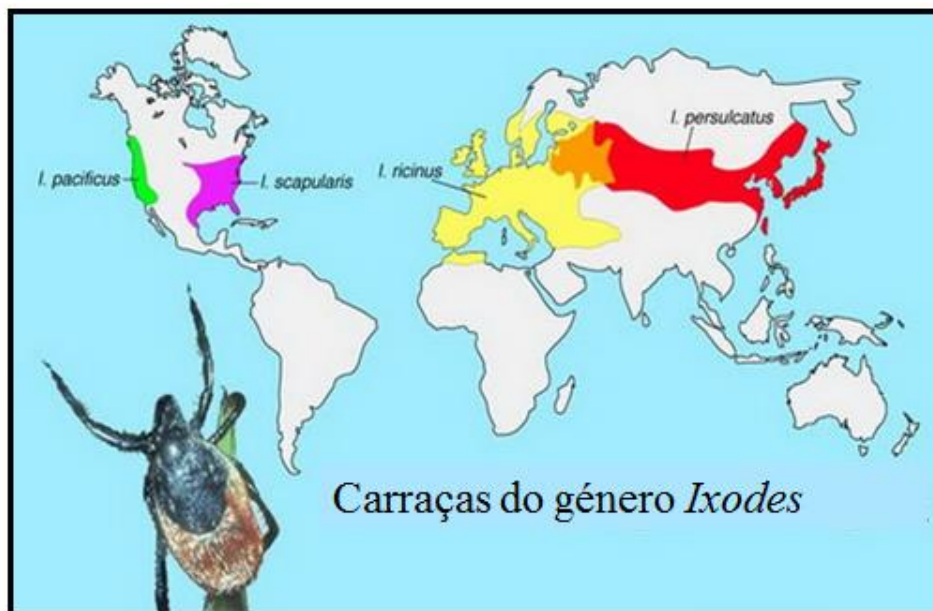
As bactérias responsáveis pela Borreliose de Lyme pertencem ao complexo *B.b.s.l.* e incluem atualmente 20 genoespécies conhecidas (Ruzic-Sabljić *et al.*, 2016), sendo que existem outras espécies que ainda necessitam de caracterização filogenética (Franke *et al.*, 2013). Até à data apenas oito (8) destas genoespécies são clinicamente relevantes: *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. lusitaniae*, *B. valasiana*, *B. bavariensis*, *B. bissettii* e *B. spielmanii* (Franke *et al.*, 2013).

As genoespécies *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. garinii* têm sido as mais diretamente relacionadas com as manifestações localizadas, disseminadas e crónicas da doença (Stanek *et al.*, 2011 a).

## 4 – EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA

### 4.1 – VETOR

As espiroquetas do complexo *Borrelia burgdorferi* s.l. podem ser transmitidas aos seus hospedeiros (incluindo humanos) por carraças do género *Ixodes*. O principal vetor na Europa é a espécie *Ixodes ricinus*, na Ásia *I. persulcatus* e na América do Norte podemos encontrar dois vetores *I. scapularis* e *I. pacificus* (Figura 6) (Stanek *et al.*, 2011 b).



**Figura 6 - Representação da distribuição mundial dos principais vetores da Borreliose de Lyme (EUCALB, 2012).**

As carraças podem sobreviver durante vários anos no seu habitat. Muitas espécies do género *Ixodes* passam a maior parte da sua existência fora dos hospedeiros, na vegetação, uma vez que a fase mais curta do seu ciclo de vida é a fase parasitária (nos hospedeiros) (Movila *et al.*, 2012).

As carraças possuem quatro estados no seu ciclo de vida, nomeadamente, ovo, larva, ninfa e adulto, e necessitam de vários hospedeiros para completar o seu ciclo, alimentando-se apenas uma vez em cada estado (Figura 7). Os adultos machos raramente se alimentam ao contrário das fêmeas, as quais produzem cerca de 2000 ovos,

sendo que uma carrapa demora, em média, cerca de três anos a completar o seu ciclo de vida (Stanek *et al.*, 2011 b).



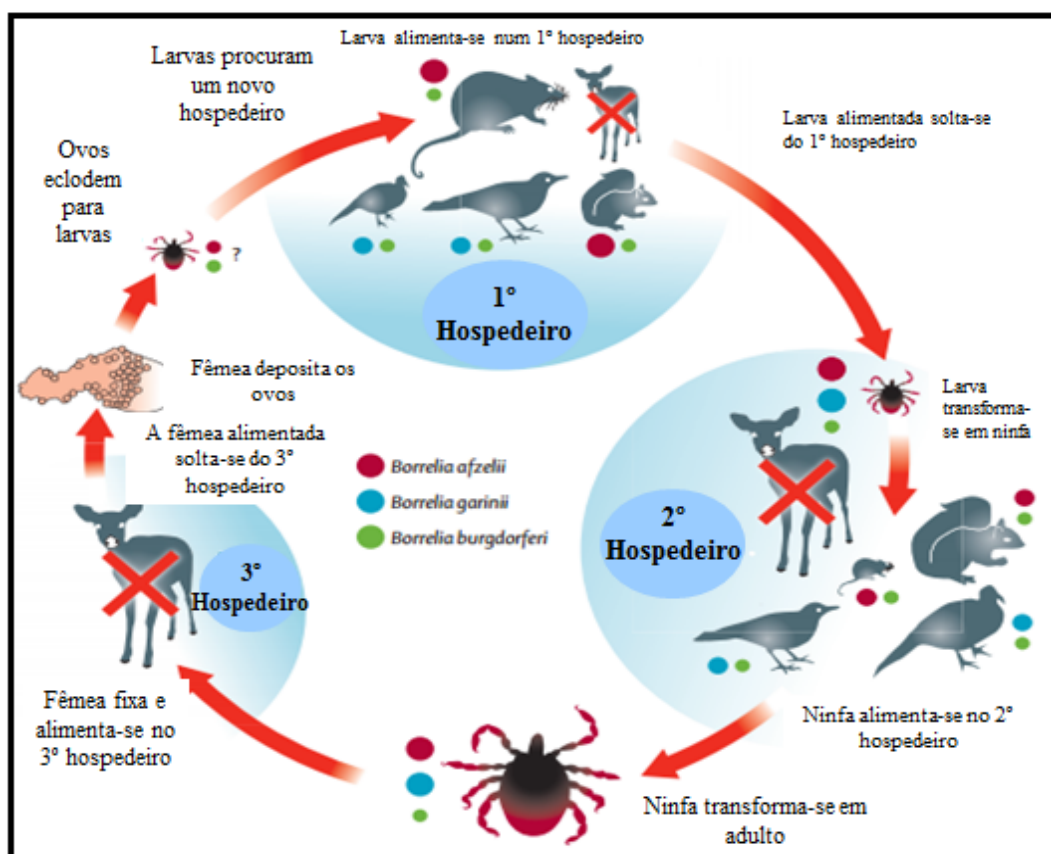
**Figura 7 – Representação gráfica de três estados do ciclo de vida das carrapas.** Da esquerda para a direita: larva, ninfa, fêmea adulta e macho adulto (Stanek *et al.*, 2011 b).

### 4.2 – HOSPEDEIROS

Os principais hospedeiros vertebrados de borrelíias do complexo (*B. burgdorferi* s.l.), são pequenos mamíferos (roedores e aves). As aves desempenham um papel muito importante na transmissão das borrelíias, uma vez que são um transporte passivo de ninfas e larvas infetadas e as aves migratórias infetadas transmitem a bactéria a carrapas de outros locais e as carrapas infetadas podem transmitir borrelíias de diversas espécies entre elas, durante a co-alimentação, enquanto são transportadas (Movila *et al.*, 2012).

O veado por sua vez é um dos hospedeiros essenciais para a manutenção da população de carrapas visto que, é dos únicos animais que consegue alimentar uma população de carrapas adultas, porém não é um reservatório competente. O fator mais importante para um hospedeiro se tornar um bom reservatório tem a ver com a suscetibilidade de cada espécie de *Borrelia* capaz de resistir à resposta imune desse hospedeiro (Figura 8) (Stanek *et al.*, 2011 b).





**Figura 8 - Representação do ciclo enzootico de transmissão de borrelíias do complexo *Borrelia burgdorferi* s.l. (Adaptado de Stanek *et al.*, 2011 b).**

#### 4.3 – TRANSMISSÃO

A transmissão aos humanos dos agentes causais da BL acontece a partir da mordedura da carrapa adulta e/ou das ninfas, o que é mais frequente no início da Primavera, podendo ocorrer até meio ou final do Verão (Stanek *et al.*, 2011 b). A capacidade destas enquanto vetores de transmitirem a bactéria é influenciada por vários fatores intrínsecos e extrínsecos. Os fatores intrínsecos incluem, comportamento, duração do período de suspensão do desenvolvimento da carrapa (diapausa), hospedeiro de preferência, estratégia de acasalamento e densidade da população de carrapas. Os fatores extrínsecos incluem, condições climáticas, tipo de vegetação, abundância, suscetibilidade e competência do reservatório (Rizzoli *et al.*, 2011). A capacidade de transmissão aos humanos pode também ser influenciada pelo tempo de fixação da carrapa, uma vez que a transmissão normalmente não ocorre nas primeiras 24h de refeição sanguínea, porém



existe uma exceção, a espécie *B. afzelii* cuja transmissão pode ocorrer rapidamente (Rizzoli *et al.*, 2011; Stanek *et al.*, 2011 b).

### 5 – MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

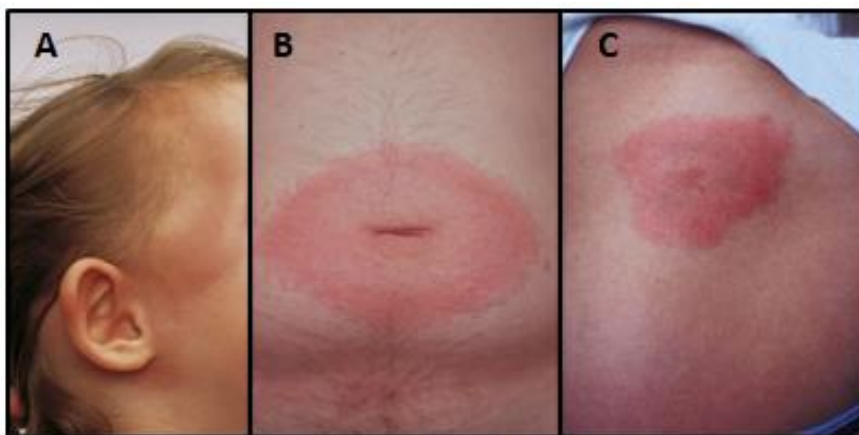
As manifestações clínicas resultam da infeção por borrélias de espécies do complexo *Borrelia burgdorferi* s.l. que geralmente dá lugar à chamada Doença de Lyme (DL) nos EUA e Borreliose de Lyme (BL) na Europa e na Ásia. São reportados inúmeros casos por ano em ambos os continentes, América do Norte e Europa Central, o que a torna como a doença cujos agentes são transmitidos por vetores mais comum no mundo (Rosa *et al.*, 2005). As borrélias são altamente móveis e invasivas, atingindo os tecidos e disseminando-se através das células endoteliais (Stanek *et al.*, 2003).

O diagnóstico da BL é essencialmente clínico e geralmente não ocorre doença sem sinais e/ou sintomas pelo que é indispensável um bom conhecimento e reconhecimento das manifestações clínicas. A pele é o tecido mais afectado com a BL, podendo ocorrer Eritema *Migrans* (EM), Linfocitoma Borreliano e Acrodermatite Crónica Atrófica (ACA) (Stanek *et al.*, 2003).

A BL possui fase aguda e persistente, podendo ser dividida em três fases:

#### Fase I – Infeção recente localizada

Nesta fase, a manifestação mais evidente e importante da doença, inclui o aparecimento de uma mancha avermelhada e ovalada no local da mordedura de carraça, denominada Eritema *Migrans* (EM) (Figura 9); aparece devido ao facto de as espiroquetas se localizarem na zona de progressão desta lesão (Rosa *et al.*, 2005). O EM afeta pessoas de todas as idades e de ambos os sexos e surge num período de 5-15 dias após a mordedura da carraça, podendo ocorrer na face, tronco, membros superiores e inferiores (O'Connell, 2014). Na Europa, a genoespécie responsável pelo EM é frequentemente *B. afzelii* enquanto que nos EUA, *B. burgdorferi* s.s. é a genoespécie implicada (Stanek *et al.*, 2003).



**Figura 9 – Imagens ilustrativas de EM.** A - EM na face de uma criança de 2 anos (O’Connell, 2014). B – EM na zona do umbigo. C – EM na parte superior da perna (Stanek *et al.*, 2003).

### **Fase II – Infecção recente disseminada**

Nesta fase da doença a bactéria pode afetar vários tecidos, no decorrer das semanas, uma vez que se dissemina através da corrente sanguínea. Pode afetar vários tecidos, nomeadamente, tecido nervoso, musculoesquelético, cardíaco e ainda a pele (O’Connell, 2014).

Os doentes podem apresentar múltiplos EM e sintomas gripais como febre, mialgias e artralgias, porém, ausência de sintomas respiratórios (O’Connell, 2014). Nesta fase pode ocorrer uma série de manifestações clínicas principais, tais como neuroborreliose recente, manifestações articulares, cutâneas, cardíacas e oftálmicas (Stanek *et al.*, 2003; Stanek *et al.*, 2011 b).

**Neuroborreliose recente** tem início com um aumento gradual de dores acompanhada de paralisia. Inclui sintomas característicos de meningite asséptica, e estados clínicos com envolvimento crânio-encefálico e nervos periféricos. Doentes que exibam meningite borreliana normalmente apresentam dores ligeiras de cabeça, por vezes intermitentes e em alguns casos dores intensas. No envolvimento ao nível do crânio e nervos periféricos, é muito frequente o aparecimento de paralisia facial unilateral ou bilateral (Figura 10) (Stanek *et al.*, 2003).



**Figura 10 – Imagem ilustrativa de Paralisia facial** (Advancecare, 2016).

As **manifestações nas articulações** decorrentes da infecção por *Borrelia* consistem na inflamação das articulações numa ou mais regiões do corpo, designa-se por **artrite de Lyme**. A sua incidência varia com o local onde a infecção foi adquirida, sendo mais frequente nos EUA do que na Europa. Em doentes geneticamente predispostos a inflamação das articulações persiste mesmo após a antibioterapia (O’Connell, 2014).

Nas **manifestações cutâneas** como já foi referido anteriormente, o EM é o principal sintoma clínico, podendo ser múltiplo, devido à disseminação sistémica das borrelíias. Pode ainda ocorrer linfocitoma borreliano (Figura 11 e 12), ou seja, um edema vermelho azulado, com diâmetro de alguns centímetros, que consiste numa infiltração de linfócitos B. A lesão normalmente está localizada no lóbulo da orelha nas crianças e na região da aréola dos mamilos nos adultos (Stanek *et al.*, 2003).



**Figura 11 - Linfocitoma borreliano** na aréola esquerda (Stanek *et al.*, 2003).



**Figura 12 - Linfocitoma borreliano** no lóbulo da orelha (Stanek *et al.*, 2011 b).

As **manifestações cardíacas**, ou **cardite de Lyme** caracterizam-se por bloqueios atrioventriculares em resultado de perturbações na condução elétrica do coração. Em doentes tratados com antibiótico o bloqueio geralmente desaparece entre 3-6 semanas (Stanek *et al.*, 2003).

As **manifestações oculares** são geralmente raras e estão associadas a outros sintomas da doença. No entanto, primeiramente, podem desenvolver-se inflamações do tecido ocular, como conjuntivite, ceratite, iridociclite, vasculite retiniana, coroidite e neuropatia ótica. Como manifestações extraoculares secundárias da doença são comuns a paresia dos nervos cranianos e miosites orbitais (Stanek *et al.*, 2003).

### **Fase III – Infecção tardia**

Esta fase da doença é menos frequente, e ocorre passados meses ou anos após a infeção. São observadas complicações clínicas, nomeadamente a **neuroborreliose de Lyme tardia**, uma manifestação neurológica extremamente severa. Esta consiste numa encefalomielite monofásica, lenta e progressiva, sendo mais comum na Europa. Na observação do Líquido Cefalorraquidiano (LCR) é possível notar pleiocitose linfocítica e concentração de proteínas elevadas (Stanek *et al.*, 2011 b).

É possível ainda observar manifestações mais severas ao nível das articulações, como artrite de Lyme crónica (Rizzoli *et al.*, 2011).

Nesta fase é também possível observar-se uma manifestação cutânea um pouco distinta designada acrodermatite crónica atrófica (ACA) (Figura 13), que consiste numa lesão inflamatória atrófica definitiva caracterizada pela alteração de coloração da pele (arroxeada), a qual é frequentemente encontrada nas mãos e pés (Stanek *et al.*, 2003).



**Figura 13** - Representação de casos de pacientes com ACA (A, B, C) (Stanek *et al.*, 2011 b).

## 6 – DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL

A BL é uma das doenças cujos agentes são transmitidos por vetores mais comuns no Hemisfério Norte, com uma distribuição global na América do Norte, Europa e algumas zonas da Ásia estando presente em cerca de 70 países do mundo (Sehgal *et al.*, 2015).

O Centro de Controlo e Prevenção de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention* (CDC)) recentemente estimou a incidência anual nos EUA em cerca de 300.000 casos e na Europa em cerca de 65.500. A BL também está presente na China com uma percentagem de infeção humana de 5,06%. Também na Rússia é considerada a doença infecciosa mais comum entre as que envolvem vetores (Sehgal *et al.*, 2015).

Dados facultados pelo CDC nos EUA apontam o sexo masculino como o que detém maior número de casos, cerca de 54% do total, no entanto, dados provenientes da Europa, indicam o oposto, ou seja, o sexo feminino tem maior propensão para a doença. No que respeita à idade a distribuição da doença é bimodal, ou seja, possui uma alta

incidência em crianças com idades compreendidas entre os 5-9 anos e em adultos com idades superiores aos 50 anos quer nos EUA quer na Europa (Borchers *et al.*, 2015).

Nos EUA, a maioria das infeções são devidas a borrélias da espécie *B. burgdorferi* s.s., a única circulante naquele país e clinicamente relevante. Embora esta espécie continue a ser a mais importante, muitas outras espécies foram descobertas desde 1995, tais como: *B. andersonii*, *B. bissetti*, *B. californiensis*, *B. carolinensis*, *B. americana* e *B. kurtenbachii*, sem que, no entanto, como já se referiu anteriormente possuam carácter patogénico declarado (Franke *et al.*, 2013).

Na Europa, existe uma elevada diversidade genética em relação às espécies de *Borrelia*. Conhecem-se atualmente nove espécies endémicas: *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. bavariensis*, *B. garinii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaneae*, *B. spielmanii*, *B. bissetti* e *B. finlandensis* (Franke *et al.*, 2013).

Na Ásia, atualmente, circulam 10 espécies, cinco das quais comuns às da Europa: *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. bavariensis*, *B. garinii*, *B. valaisiana*, e ainda *B. japonica*, *B. tanukii*, *B. turdi*, *B. sínica* e *B. yangtze* (Franke *et al.*, 2013). No Norte de África foram encontradas várias espécies, *B. lusitaneae*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* s.s. e *B. valasiana*. (Franke *et al.*, 2013).

## 7 – DIAGNÓSTICO DA DOENÇA

### 7.1 – DIAGNÓSTICO CLÍNICO

O diagnóstico de BL é fundamentalmente clínico, ou seja, são avaliados os sinais e sintomas, a história clínica do doente, dados epidemiológicos e exposição/mordedura de carraça. Embora seja imprescindível o diagnóstico clínico, o acentuado polimorfismo dos sintomas associados e um elevado número de manifestações sobreponíveis com outras doenças leva a que seja necessária uma abordagem complementar do diagnóstico a partir de testes laboratoriais sensíveis e específicos (Tugwell *et al.*, 1997; Couceiro *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2010).

## 7.2 – DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico de BL, como já referido, deve ser primeiramente baseado nas manifestações clínicas apresentadas pelo doente. O diagnóstico laboratorial é usado como apoio, devido à natureza inespecífica das manifestações clínicas relatadas pelos doentes (Stanek *et al.*, 2011 c).

O diagnóstico laboratorial é baseado na pesquisa do agente etiológico, as borrelíias do complexo *B. burgdorferi* s.l., quer por cultura quer por isolamento da bactéria ou pesquisa do seu DNA por amplificação do mesmo através de técnicas moleculares (PCR – reação de polimerase em cadeia) ou na serologia, pela deteção de anticorpos específicos. Assim, são usados métodos diretos e indiretos, respetivamente (Santos *et al.*, 2010).

### Métodos Directos

- Cultura

A cultura de espiroquetas do género *Borrelia*, a partir de amostras biológicas do doente é o método *Gold standard* para o diagnóstico laboratorial de BL (Stanek *et al.*, 2011 c). Porém o crescimento deste tipo de espiroquetas requer condições especiais, desde logo um meio de cultura seletivo Barbour-Stoenner-Kelly (BSK) ou então um meio modificado como o Kelly-Pettenkofer (MKP), e requer também um tempo de incubação longo e observação (cerca de 12 semanas) uma vez que, estas bactérias se multiplicam lentamente (Marques, 2010). Dadas estas condições e o baixo número de espiroquetas viáveis presentes, por exemplo nas biopsias e fluidos orgânicos (sangue, soro, LCR) a cultura destas bactérias a partir das referidas amostras pode não ser possível devido ao facto do inóculo não ser suficiente, pelo que o resultado da cultura é muito variável, sendo que, um resultado negativo (ausência de crescimento bacteriano), não exclui a possibilidade de infeção ativa. Estas limitações justificam que este método não seja muito utilizado como primeira linha de suporte ao diagnóstico clínico (Stanek *et al.*, 2011 c).

- Amplificação de DNA de *Borrelia* (PCR)

A amplificação de ácidos nucleicos usando a técnica de PCR é útil na detecção e identificação de uma vasta gama de microrganismos de crescimento fastidioso, uma vez que deteta um baixo número de cópias (Stanek *et al.*, 2011 c).

Como já referido, a técnica de PCR permite a amplificação de DNA genómico a partir de amostras de diversa natureza [sangue, pele, líquido cefalorraquidiano (LCR) e líquido sinovial, entre outras] (Marques, 2010). É o método mais rápido e sensível para a confirmação do diagnóstico clínico, no entanto, esta técnica ainda não foi padronizada, uma vez que os protocolos e os genes alvo que estão na base do desenho das sequências iniciadoras (*primers*) e respetivos protocolos variam entre laboratórios (Rizzoli *et al.*, 2011).

Esta técnica também apresenta desvantagens, uma vez que não é possível precisar se uma infeção está ativa ou não, pois um resultado negativo não quer necessariamente dizer que há ausência do agente etiológico. O uso da técnica de PCR para confirmar um diagnóstico de BL não é recomendado, dado que é necessário confirmar a evidência serológica do agente (Rizzoli *et al.*, 2011).

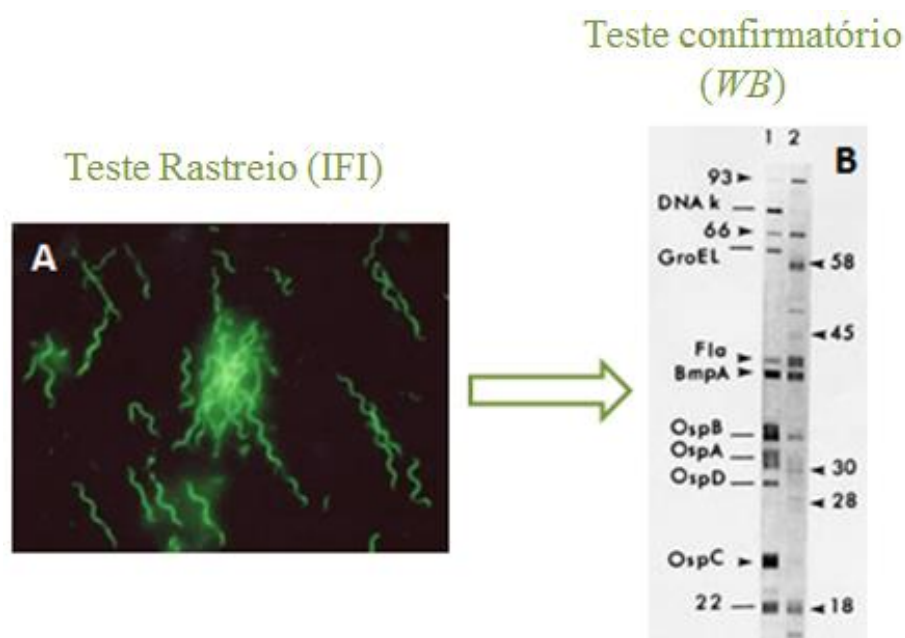
### **Métodos Indiretos**

Os testes serológicos são normalmente usados como primeira linha no diagnóstico de BL, uma vez que a obtenção de amostras é fácil e possuem aceitável especificidade e sensibilidade. Na ausência de EM e de manifestações clínicas específicas são mais indicados e fornecem informação útil acerca dos doentes que tenham indícios de infeção num estado mais tardio e/ou disseminado da doença (Marques, 2010; Rizzoli *et al.*, 2011; Stanek *et al.*, 2011 c).

Os métodos serológicos mais usados na detecção de anticorpos de *B. burgdorferi* s.l. incluem a imunofluorescência indireta (IFI), ensaios imunoenzimáticos como *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e *Western blot* (WB) (Rizzoli *et al.*, 2011; Aguero-Rosenfeld *et al.*, 2005).



As técnicas de IFI e ELISA podem dar azo a um número significativo de resultados falso-positivos devido à presença de reatividade cruzada de antígenos. Assim para o serodiagnóstico de BL é recomendado o uso de duas abordagens: um teste inicial que funciona como rastreio (IFI ou o teste ELISA), devido à sua fraca sensibilidade, e um segundo teste confirmatório (WB), aumentando a sensibilidade e especificidade (Figura 14). O teste WB é usado quando os resultados do teste de rastreio são indeterminados ou positivos e permite avaliar a presença de anticorpos IgG e IgM específicos face a fracções antigénicas (proteínas) *major* e determinantes para o diagnóstico (Marques, 2010).



**Figura 14 - Representação da metodologia de duas abordagens para o diagnóstico de BL.** A- Reacção de imunofluorescência positiva (ALDF, 2016). B – Representação de membrana de teste *Western blot* com visualização de fracções antigénicas específicas (resultado positivo) (CDC, 2015) (montagem esquemática da autora).

## 8 – ABORDAGENS TERAPÊUTICAS

### 8.1 – ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS

O melhor método para prevenir a infecção por espiroquetas de *B. burgdorferi* s.l. é evitar o contacto com o vetor, isto é, as carrças do género *Ixodes*. No entanto, se o contacto ocorrer é possível prevenir a possível progressão da doença com a utilização de doses únicas de antimicrobianos, como doxiciclina, caso se verifiquem algumas circunstâncias tais como (Wormser *et al.*, 2006):

- Se a carrça fixada ao hospedeiro for identificada como uma fêmea adulta ou ninfa e estiver infetada, e permanecer agarrada à pele por um tempo de, pelo menos, 36 horas;
- A profilaxia deve iniciar-se até às 72h após a remoção da carrça;
- Existência de informação ecológica que indique que a taxa de infecção das carrças desse local é superior a 20%;
- O tratamento com doxiciclina não ser contra-indicado.

Quando efetivamente ocorre mordedura da carrça e infecção por espiroquetas de espécies de *B. burgdorferi* s.l. a terapêutica varia conforme o estado da doença e, inclusivamente o sistema ou órgão afectado.

#### **Infeção recente localizada**

Os doentes que apresentem sintomas correspondentes à fase de infecção recente localizada, ou seja, apenas com um EM são tratados com antimicrobianos de administração oral: doxiciclina (100 mg duas vezes por dia), amoxicilina (500 mg três vezes por dia) ou cefuroxima axetil (500 mg duas vezes por dia) por um tempo variável de 10-21 dias (14) dependendo do antimicrobiano prescrito (quantidades administradas a adultos sem contra-indicações) (Wormser *et al.*, 2006).

A administração de macrolidos, tais como azitromicina (500 mg por dia), é recomendada como segunda linha de tratamento, uma vez que estes fármacos são menos

eficazes, e são administrados apenas em caso de intolerância aos de primeira linha, referidos anteriormente (Wormser *et al.*, 2006; Stanek *et al.*, 2011 b).

### **Infeção disseminada recente ou infeção tardia**

Quando os doentes manifestam sintomas correspondentes com a fase disseminada ou tardia da doença são geralmente administrados antimicrobianos intravenosos e orais (durante um período de tempo superior). Na presença de neuroborreliose é aconselhada a administração intravenosa de antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, ceftriaxona (2 g por dia) ou penicilina G (18-24 Mio por dia). No entanto, para pacientes intolerantes é administrada doxiciclina (100 mg duas vezes por dia) por via oral, 10-30 dias (14) para os antimicrobianos intravenosos e 14-30 dias (21) para a doxiciclina. Quando o doente apresenta artrite de Lyme intermitente ou crónica, cardite de Lyme e ACA é administrada oralmente doxiciclina (100mg duas vezes por dia) e amoxicilina (500 mg três vezes por dia) e de forma intravenosa ceftriaxona (2 g por dia) durante cerca de 21 dias (14-30 dias) (Stanek *et al.*, 2003).

Alguns doentes, aos quais foram administrados tratamentos com diversos antimicrobianos, podem manifestar síndrome de borreliose de Lyme crónica pós-tratamento, ou seja, mesmo após a terapêutica sofrem de alguns sintomas tais como fadiga persistente, mialgias, artralguas, parestesias ou disestesias ou distúrbios de memória (Stanek *et al.*, 2003). Na Europa, no caso de doentes seropositivos para *Borrelia*, que não apresentem sintomas da doença não é recomendado qualquer antimicrobiano, ficando, no entanto, atento a alguma sintomatologia que possa advir. Nos EUA, em alguns casos é administrado doxiciclina como forma de prevenir a progressão da doença (Stanek *et al.*, 2003).

## **8.2 – PRODUTOS NATURAIS**

O uso de antimicrobianos como terapia contra a BL tem sido usada até aos dias de hoje, porém, o tratamento é efetuado durante longos períodos de tempo, aproximadamente um mês. No entanto, a exposição do organismo a antimicrobianos poderia ser auxiliada por produtos naturais, algo que iria suavizar as consequências (efeitos secundários) da

terapêutica. Até à data, apenas alguns metabolitos provenientes de plantas sofreram avaliação científica relativa a sua possível atividade antimicrobiana contra *Borrelia* spp, como por exemplo extratos de sementes de uva e extratos da raiz de plantas da espécie *Dipsacus sylvestris* (Brorson *et al.*, 2007; Liebold *et al.*, 2011). Recentemente, em 2015, Goc e colaboradores testaram a eficácia de 15 compostos naturais provenientes de plantas, tendo encontrado eficácia contra *Borrelia* spp., nos compostos de baicaleína e monolaurina, demonstrando a importância dos grupos fenólicos e dos ácidos gordos na atividade anti-borrélia (Goc *et al.*, 2015).

## 9 – NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS

### 9.1 – PLANTAS MEDICINAIS

A utilização de plantas com fins medicinais no tratamento de doenças, é tão antigo quanto o ser humano. Atualmente as plantas medicinais são comercializadas em feiras livres e mercados populares, sendo grande parte encontrada em farmácias e lojas de produtos naturais (Maciel *et al.*, 2002; Veiga Jr. *et al.*, 2005).

Nos EUA e na Europa tem-se verificado um aumento no uso de plantas com fins terapêuticos. A Alemanha, por exemplo, é o país da Europa em que se consome metade dos extratos vegetais de todo o continente. Estes são geralmente utilizados para o tratamento da gripe, dores de cabeça, insónias, úlceras gástricas, bronquite, doenças de pele, entre outras (Maciel *et al.*, 2002; Veiga Jr. *et al.*, 2005).

Estudos farmacológicos efetuados *in vitro* de extratos e de óleos essenciais de plantas, demonstraram ser um ótimo recurso ao combate de alguns microrganismos responsáveis por algumas doenças. Holetz e colaboradores (2002) demonstraram um bom desempenho das espécies *Arctium lappa*, *Psidium guajava*, *Lippia alba*, *Eugenia uniflora* e *Punica granatum* contra algumas bactérias, nomeadamente, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Estas plantas também demonstraram possuir atividade antifúngica contra algumas espécies de

*Candida*, nomeadamente, *C. krunsei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (Holetz *et al.*, 2002).

Muitos dos extratos de plantas utilizados, têm tropismos para sistemas ou órgãos específicos do corpo, sendo que, a ação do extrato pode atuar além do tratamento da doença, exceto a espécie *Hydrastis candensis* que além de possuir atividade antimicrobiana, aumenta o fornecimento de sangue no baço, promovendo uma ótima mediação na libertação de compostos (Iwu *et al.*, 1999).

Atualmente, a utilização de plantas no mercado farmacêutico tem como principal objetivo a identificação de princípios ativos, para a formulação de novos medicamentos com uma toxicidade inferior em relação aqueles que não são formulados com origem em plantas (Lima, 2007). A aspirina, é um dos exemplos mais conhecidos, de uma planta que stá na origem de um medicamento usado por toda a população, cujo princípio ativo é o ácido acetilsalicílico, obtido da planta *Filipendula ulmaria* (Lima, 2007).

### 9.2 – PLANTAS DO CERRADO BRASILEIRO

Atualmente o Brasil é conhecido pela sua rica biodiversidade, incluindo uma vasta gama de plantas, que têm sido utilizadas pela população para fins medicinais, com a finalidade de tratar uma diversidade de doenças. As plantas têm revelado ser uma ótima fonte de compostos bioativos, atuando como antioxidantes, anti-inflamatórios além de possuírem também, em alguns casos, atividade anti-neoplástica (Vieira *et al.*, 2012).

O Brasil é constituído pela maior diversidade vegetal do planeta, distribuída por seis Biomas principais, sendo eles: Cerrado, Amazónia, Floresta Atlântica, Pantanal, Caatinga e Pampas (Figura 15) (Araújo *et al.*, 2012).

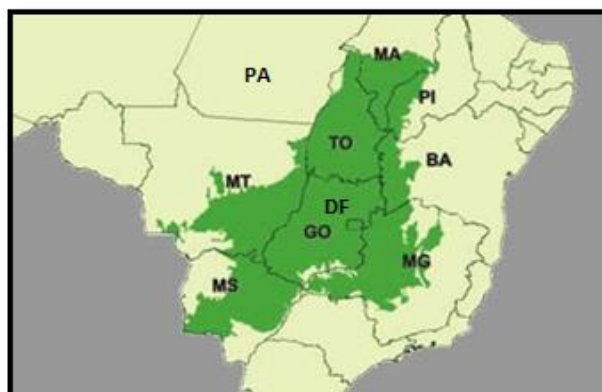
**Figura 15** - Mapa representativo do Brasil e respectivos Biomas (in Planeta Biologia, 2015).



O Cerrado cobre cerca de dois milhões de quilômetros quadrados da superfície do Brasil Central, representando 23% da superfície terrestre do país (Ratter *et al.*, 1997). É constituído por um conjunto de ecossistemas (savanas, matas, campos e matas de galeria), sendo, portanto, considerado o segundo maior Bioma Brasileiro, ultrapassado em área, apenas pela Amazônia. Suporta uma grande variedade de espécies, sendo as plantas conhecidas como fonte de compostos de elevado interesse biotecnológico, com aplicações na indústria alimentar e medicina (Klink *et al.*, 2005; Souza *et al.*, 2012 b).

A distribuição da flora do Cerrado Brasileiro abrange algumas regiões do Sul do país (S. Paulo e Minas Gerais), Sudeste (Minas Gerais), Centro (Distrito Federal, Goiás e parte de Minas Gerais), Ocidente (Mato Grosso, Goiás e Mato Grosso Sul) e regiões do Norte (Maranhão, Tocantins e Pará) (Figura 16) (Ratter *et al.*, 1997).

**Figura 16** - Distribuição da vegetação do Cerrado Brasileiro. DF- Distrito Federal; GO: Goiás; MA: Maranhão; MG: Minas Gerais; MS: Mato Grosso Sul; MT: Mato Grosso; PA: Pará; TO: Tocantins (adaptado de Ratter *et al.*, 1997).



As plantas do Cerrado são utilizadas por toda a população, sendo que esta, também faz uso de plantas exóticas domesticadas como as espécies *Romarinus officinalis* L., *Achynocline satuneioids* D.C, *Cymbopogon citratos* D.C, *Mentha* sp., *Aloe vera* L. entre outras (Vila Verde *et al.*, 2003).

Em algumas regiões do país as plantas mais utilizadas pela população são: *Bacharis trímera*, mais conhecida como carqueja, *Croton antisiphiliticus* conhecida como canela-de-perdiz, *Lychnophora pinaster* conhecida como arnica, entre muitas outras. São usadas fundamentalmente para o tratamento de reumatismo, diabetes, má circulação sanguínea, sífilis, colesterol elevado, paralisias, infecções do aparelho urinário, entre outras (Rodrigues *et al.*, 2001).

Como se pode comprovar, a utilização de substitutos naturais por medicamentos sintetizados a partir de químicos, é uma metodologia bastante aceita e utilizada pela população Brasileira. Mais recentemente a Organização Mundial de Saúde (OMS), afirmou que no mundo 20.000 espécies de plantas são usadas para fins medicinais (OMS citado por Scorzoni *et al.*, 2007).

### 9.3 – ESPÉCIE *Eugenia dysenterica* MART. DC

#### 9.3.1 – Taxonomia, Classificação e Características

A família Myrtaceae é umas das famílias de plantas mais importantes nas florestas tropicais. É constituída por 121 géneros e 3800 a 5800 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Esta família possui características que permitem o seu reconhecimento, como a presença de glândulas de óleos nas folhas, ovários inferiores e semi-inferiores, “polystemonous flowers” com numerosos estames, floema interno, e pontuações ornamentadas nos vasos de xilema (Stefanello *et al.*, 2011).

No Brasil, a distribuição da família Myrtaceae reparte-se por 23 géneros e cerca de 1000 espécies. O género *Eugenia* representa um terço das espécies desta família, encontrando-se bem representada em diversos habitats. Muitas espécies representativas

deste género são ricas em óleos essenciais e taninos, aproveitados para o uso na medicina popular (Romagnolo *et al.*, 2006).

*Eugenia dysenterica* Mart. DC é uma espécie nativa do Cerrado Brasileiro que aparece em áreas de cerrado e cerradão, estão adaptadas a solos pobres em nutrientes. Esta planta apresenta fecundação cruzada e autofecundação. A sua árvore frutífera pode atingir os 10 metros de altura, possui casca grossa, fissurada e os seus ramos e troncos são tortuosos (Figura 17) (Silva *et al.*, 2001).



**Figura 17** - Árvore da espécie *Eugenia dysenterica* (in Biologo, 2009).

Esta planta está distribuída em várias regiões do Brasil, nomeadamente, Minas Gerais, Tocantins, Goiás, São Paulo e Mato Grosso do Sul (Cerratinga, 2016).

### 9.3.2 – Utilizações

Esta espécie é também conhecida como “cagaiteira”, devido ao seu fruto designado por cagaita. A cagaita é um fruto com 3 a 4 cm de comprimento, possui formato globoso, bagáceo e de cor amarelo-claro. Tem um sabor ligeiramente ácido e o seu epicarpo é membranoso (Silva *et al.*, 2001).



Os frutos são consumidos ao natural ou processados, na forma de doces, gelados, geleias e sumos (Silva *et al.*, 2001). O seu consumo em demasia ou o consumo de frutos fermentados pelo calor, têm efeitos laxantes (Biologo, 2009).

### 9.3.3 – Utilizações Terapêuticas

A espécie *Eugenia dysenterica* faz parte da flora apícola do Cerrado e as suas folhas e cascas já foram testadas por vários autores, contra diversas condições clínicas. As folhas de *E. dysenterica* são simples, opostas, glabras e de margem lisa. Este órgão da planta evidenciou ter atividade antidiarréica, atividade contra diabetes e contra icterícia (Silva *et al.*, 2001; Biologo, 2009). Foi igualmente demonstrada atividade antifúngica contra *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* (Costa *et al.*, 2000), efeito gastroprotetor associado a úlceras (Prado *et al.*, 2014), atividade inibitória da alfa-amilase e alfa-glucosidase (Souza *et al.*, 2012 a), atividade antiviral contra rotavírus, associados a diarreias severas (Cecílio *et al.*, 2012) e ainda presença de atividade antioxidante (Prado *et al.*, 2014).

## 9.4 – ESPÉCIE *Pouteria ramiflora* MART. RADLK

### 9.4.1 - Taxonomia, Classificação e Características

A família Sapotaceae tem distribuição mundial, especialmente em regiões tropicais e subtropicais da África e América do Sul. É constituída por 53 géneros e cerca de 1250 espécies (Silva *et al.*, 2008). Esta família possui algumas características que lhe permite ser distinguida de outras famílias: são árvores ou arbustos, monóicos ou dióicos, lactescentes, as suas flores são unissexuadas ou bissexuadas, as folhas são alterno-espiraladas ou alterno-dísticas e simples e possuem ovários superiores (Queiroz *et al.*, 2011).

No Brasil, a família Sapotaceae está distribuída em 14 géneros e cerca de 200 espécies. O género *Pouteria* é o maior da família, detém cerca de 325 espécies, tendo a principal relevância no Brasil, principalmente pelo facto de estar bem distribuída, atingindo cerca

de 114 espécies, sendo que, 46 são espécies endêmicas. As plantas deste gênero são muito utilizadas como fonte de madeira e fornecedoras de frutos para consumo humano (Queiroz *et al.*, 2011; Monteiro *et al.*, 2007 a).

*Pouteria ramiflora* Mart. Radlk é uma espécie distribuída em vários dos Biomas Brasileiros, estando presente no Cerrado, Floresta Amazônica, Floresta Atlântica e Caatinga. A sua árvore apresenta-se lactescente e cresce de 4 a 8 metros de altura, o tronco é geralmente cilíndrico e retilíneo e apresenta casca cinzenta. As flores germinam aglomeradas nos ramos, de 3 a 12 flores por ramo e são formadas por quatro pétalas verdes (Figura 18) (Colecionandofrutas, 2016).



**Figura 18** - Árvore de *Pouteria ramiflora* (in Cerradonline, 2009).

Esta planta pode ser encontrada nos Estados da Bahia, Ceará, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso Sul, Pará, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, São Paulo e Tocantins, no Brasil (Monteiro *et al.*, 2007 b).

### 9.4.2 – Utilizações

A espécie *Pouteria ramiflora* é também conhecida por: Abiu-Carriola, Leiteiro Preto, Grão de Galo, Pitomba de Leite e Guapeva Pilosa. Os seus frutos têm 3 a 5 cm e são

piriformes ou ovadas. A casca não possui tricomas, apresenta cor amarela-esverdeada, e a sua polpa é de cor amarela (Colecionando frutas, 2016).

Os frutos são consumidos ao natural ou processados em gelados, sumos, geleias, recheios de bolo ou bolachas (Colecionando frutas, 2016). Há também referência de que esta planta também é utilizada para extrair tinta vermelha proveniente da casca da árvore (Monteiro *et al.*, 2007).

### 9.3.3 – Utilizações Terapêuticas

As folhas de *P. ramiflora* estão agrupadas no ápice dos ramos e são inteiras, alternas, espiraladas e coriáceas, possuindo as nervuras evidenciadas. Os extratos etanólicos das folhas desta planta do Cerrado Brasileiro evidenciaram atividade neuroprotetora contra danos oxidativos, restaurando os níveis de miosina-va no cérebro e prevenção de perda do hipocampo neuronal no CA3 (correspondente à região 3 do “Corno de Amon”) e no subcampo do hilo em ratos com diabetes (Costa *et al.*, 2013). Os extratos provaram também, inibição da alfa-amilase salivar, reduzindo os níveis de glicose sanguínea (Gouveia *et al.*, 2013).

## **II – MATERIAL E MÉTODOS**

## II – MATERIAL E MÉTODOS

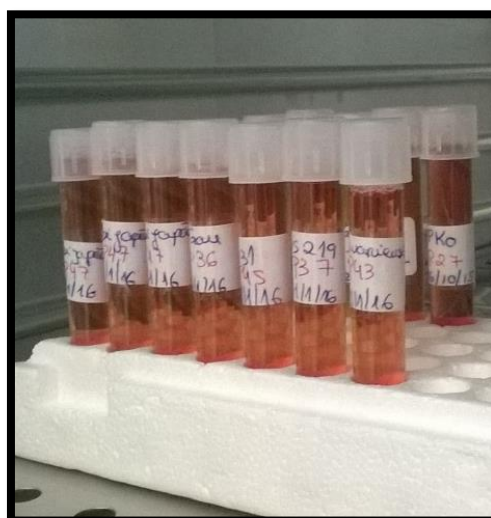
### 1 - CULTURAS DE REFERÊNCIA DE ESPÉCIES DO COMPLEXO *Borrelia burgdorferi* s.l.

No presente estudo, foram utilizadas quatro estirpes tipo *American Type Culture Collection* (ATCC) de *B. burgdorferi* s.l. da bateria de referência existente no Laboratório de Leptospirose e Borreliose de Lyme (LLBL) da Unidade de Microbiologia Médica (UMM) do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT). As estirpes utilizadas estão descritas na Tabela 1 e ilustradas na Figura 19.

**Tabela 1** – Espécies / Estirpes do complexo *B.burgdorferi* s.l. utilizadas neste estudo (StrainInfo, 2006).

Espécie	Estirpe	ATCC®
<i>B. burgdorferi</i> s.s	B31	35210
<i>B. garinii</i>	PBi Japão	51991
<i>B. bavariensis</i>	PBi	BAA2496
<i>B. afzelii</i>	P Gau	51567

**Figura 19** – Tubos contendo estirpes das diferentes espécies de *B. burgdorferi* s.l. em cultura [meio seletivo (BSK líquido)], mantidos em estufa a 34 °C (foto original da autora).



### 1.1 - MANUTENÇÃO DAS CULTURAS (SUBCULTIVO EM MEIO SELETIVO)

A manutenção das culturas das estirpes mencionadas anteriormente, foi feita de acordo com os procedimentos de rotina do laboratório. Cada estirpe foi cultivada em meio seletivo BSK líquido, manufaturado *in house* (Anexo1), seguindo-se um período de incubação na estufa a 34° C, sob condições de anaerobiose (ATCC, 2016), por um período de uma a duas semanas (em geral 5-7 dias, quando bem adaptadas ao meio de cultura), até atingirem um crescimento correspondente a aproximadamente  $10^8$  espiroquetas/mL.

Diariamente as culturas foram observadas macroscopicamente para avaliação de presença/ausência de crescimento bacteriano, através da alteração de cor do meio (alteração de vermelho para amarelo), o que se deve à variação do pH (Figura 20), tendo em especial atenção qualquer indício de contaminação através da presença de turbidez, uma vez que pode ser facilmente confundida com crescimento de espiroquetas, já que que a mesma altera de igual forma a cor do meio.

**Figura 20** – Exemplo da alteração da cor do meio de cultura BSK. Coloração amarela, evidencia crescimento de borrélias; coloração vermelha mostra uma cultura em que as borrélias estão ainda em crescimento (*foto original da autora*).



A repicagem de cada cultura foi realizada, a partir de subculturas recentes, quando se verificou crescimento bacteriano através de alteração de cor do meio e existência de motilidade das borrélias, por observação em microscópio de fundo escuro (microscópio Olympus® BH-2).

As sucessivas repicagens (passagens) foram efetuadas em tubos estéreis de 5 mL em meio BSK líquido, com inóculo de 6-12 gotas (1 gota  $\cong$  35 $\mu$ l) de culturas recentes. Para isso, estes procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar e à chama (Bico de Bunsen), para evitar qualquer tipo de contaminação (Veinovic *et al.*, 2013)

## 2 – IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA E EXTRATOS VEGETAIS

Neste estudo foram utilizados extratos de partes das plantas *Eugenia dysenterica* DC (*Hexachlamys macedoi* Legrand) e *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk, coletadas no bioma Cerrado, Brasília, Distrito Federal, Brasil, e identificadas pelos botânicos Christopher William Fagg e Suelí Maria Gomes. Depois de identificadas, as plantas foram depositadas em exsicata no Herbário da Universidade de Brasília (UnB) onde receberam um registo de *Voucher* (Tabela 2).

**Tabela 2** – Espécie, Família e ‘*Voucher* das plantas utilizadas para os extratos.

Família	Espécies de Plantas	<i>Voucher</i>
Myrtaceae	<i>Eugenia dysenterica</i> (Mart.) DC	914 (UB)
Sapotaceae	<i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk	3671 (UB)

### 2.1– OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS

Para obtenção do extrato, o material botânico foi seco em estufa com circulação de ar a temperatura inferior a 40° C, e em seguida submetido a pulverização em moinho de facas (*Marconi Laboratory Equipment*, Piracicaba SP, Brasil). O pó obtido (40 g) foi macerado em 2 L de etanol 95 % por um período de 7 dias, posteriormente a solução resultante foi concentrada num evaporador rotativo Hei-Vap acoplado à bomba de vácuo modelo D-91126 (*Heidolph Instruments GmbH & Co KG*, Walpersdorfer, Schwabach) e refrigerador modelo MX07R-20-HD2E (*Heidolph Instruments GmbH & Co KG*, Walpersdorfer, Schwabach) para manter a temperatura inferior a 40° C e pressão reduzida para obtenção do extrato etanólico. O extrato aquoso foi obtido por

infusão utilizando 400 g do material botânico embebido em 3 L de água destilada por um período de 7 dias. Após a filtração, o solvente foi removido por liofilização usando o equipamento Advantage Plus XL-70 acoplado a bomba de vácuo modelo 2005SD e compressor de ar modelo 1NNE5 (SP Scientific, Warminster, PA, EUA) (Souza *et al.*, 2012 b).

Para o presente trabalho, 100 mg dos extratos etanólicos e aquosos foram solubilizados em 1 mL dos solventes específicos, obtendo as soluções *stock* com concentração final de 100 mg/mL (Tabela 3).

Todos os extratos vegetais foram produzidos pelo Laboratório de Produtos Naturais da Faculdade de Ciências da Saúde (FS) da Universidade de Brasília (UnB) e gentilmente cedidos pela Professora Doutora Dâmaris Silveira.

Para facilitar a identificação dos extratos, estes foram identificados conforme a planta e o solvente de origem, sendo EDY1 (extrato aquoso) e EDY2 (extrato etanólico) provenientes da planta *Eugenia dysenterica* (Mart.) DC, e os extratos PR1 (aquoso) e PR2 (etanólico) provenientes de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk (Tabela 3).

**Tabela 3** – Identificação e caracterização dos extratos a utilizar neste estudo.

Código	Espécie	Parte da Planta	Extrato	Peso do extrato	Solvente	Volume de solvente	Concentração
<b>EDY1</b>	<i>Eugenia dysenterica</i> (Mart.) DC	folhas	aquoso	100 mg	Água destilada	1ml	100 mg/ml
<b>EDY2</b>	<i>Eugenia dysenterica</i> (Mart. DC	folhas	etanólico	100 mg	Etanol	1ml	100 mg/ml
<b>PR1</b>	<i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk	folhas	aquoso	100 mg	Água destilada	1ml	100 mg/ml
<b>PR2</b>	<i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk	folhas	etanólico	100 mg	Etanol	1ml	100 mg/ml



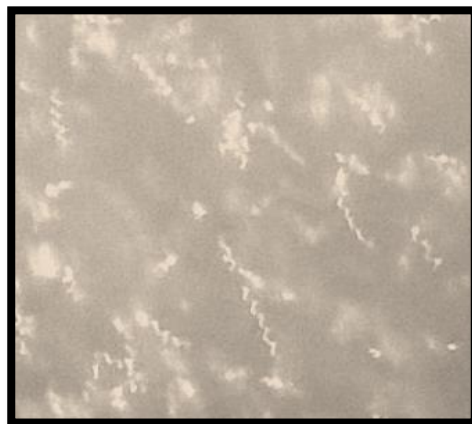
### 3 - ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS *in vitro*

#### 3.1 – PREPARAÇÃO DA CULTURA

Para iniciar o teste de atividade antimicrobiana dos extratos sob cada estirpe, foi necessário uma preparação prévia das culturas, uma vez que, apresentavam um tempo de crescimento diferente, de estirpe para estirpe. Para tal, as culturas foram quantificadas quanto à concentração bacteriana usando um espectrofotômetro (Bio-Rad® Smart Space plus, Philadelphia, EUA) com filtro de 600 nm e um fator de conversão em que a densidade ótica (D.O.) corresponde a  $5 \times 10^8$  células/mL. Foi também efetuada a observação em microscopia de fundo escuro para confirmação da viabilidade das borrélias em cultura e da existência de alguma eventual contaminação (Figura 21).

Uma vez confirmada a referida viabilidade, procedeu-se à realização da diluição de cada estirpe, em meio BSK líquido para uma concentração final ideal de  $10^7$  células/mL (Veinovic *et al.*, 2013).

**Figura 21** – Microfotografia representativa de uma cultura de espiroquetas de *B.burgdorferi* s.l., observando-se a forma espiralada das mesmas (400×) (foto original da autora).



#### 3.2 – PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS

Para este ensaio partimos de uma solução *stock* de 100 mg/mL, de cada um dos extratos, a partir do qual se fez uma diluição inicial de 1:10, ou seja, 150 µL do extrato e 1350

μL de solvente (BSK líquido), para se obter uma solução final com uma concentração de 10000μg/mL de EDY1, EDY2, PR1 e PR2.

### 3.3– TESTE DE SUSCETIBILIDADE POR MICRODILUIÇÃO

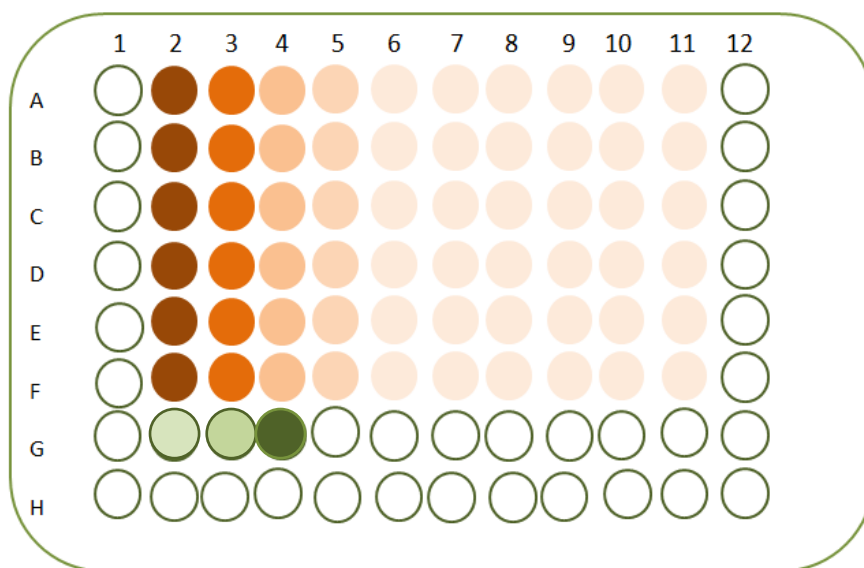
A Concentração Inibitória Mínima [Minimal Inhibitory Concentration (MIC)] de cada um dos extratos em estudo foi determinada pelo método de microdiluição descrito na norma M27-A2 do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) com algumas modificações (CLSI, 2002).

O ensaio de microdiluição foi realizado em placa estéril de 96 poços. Na primeira etapa da preparação do teste de suscetibilidade partiu-se de uma concentração de 10000μg/mL de extrato previamente preparada e fizeram-se diluições seriadas de cada um dos mesmos, com meio BSK líquido, de que resultaram as seguintes concentrações dos extratos vegetais: 10000; 5000; 2500; 1250; 625; 312,5; 156,3; 78,1; 39,1; 19,5 μg/mL. Na etapa seguinte foram adicionados 100 μL de cultura de cada estirpe do complexo *B.burgdorferi* s.l., em cada um dos poços da placa previamente preparados com as respectivas concentrações de extratos. Em todos os ensaios, a adição de cultura de *Borrelia* aos extratos, não foi considerada para a diluição final, sendo assim considerada como concentração final, a diluição previamente realizada.

Como controlo negativo, utilizou-se meio BSK líquido, para garantir que o mesmo se encontrava estéril, e utilizou-se também cultura pura da estirpe em estudo, e por fim, extrato diluído com meio BSK líquido, para se poder detetar a presença de alguma contaminação e também se ocorreria alguma reação entre o meio BSK líquido e o extrato. Como controlo positivo utilizou-se o antibiótico doxiciclina (Hunfeld *et al.*, 2006) na concentração 10000 μg/mL, nas mesmas diluições seriadas dos extratos.

No final procedeu-se à cobertura da microplaca e à selagem da mesma com parafilme. As microplacas foram a incubar em câmara de anaerobiose e em estufa a 34° C durante 72 horas.

Para garantir a reprodutibilidade de cada ensaio, para cada estirpe e extrato estudados, foram realizados três ensaios independentes em triplicado, e cada um deles com duas réplicas (Figura 22).



**Figura 22 – Representação esquemática da microplaca:** A2- 10000 µg/mL; A3 – 5000 µg/mL; A4 – 2500 µg/mL; A5 – 1250 µg/mL; A6 – 625 µg/mL; A7 – 312,5 µg/mL; A8 – 156,3 µg/mL; A9 – 78,1 µg/mL; A10- 39,1 µg/mL; A11 – 19,5 µg/mL. G2- controle meio BSK líquido; G3 – controle cultura *Borrelia* spp; G4 – controle extrato. Os poços representados a branco não são utilizados no teste (*esquema original da autora*).

#### 4– DETERMINAÇÃO DE MIC

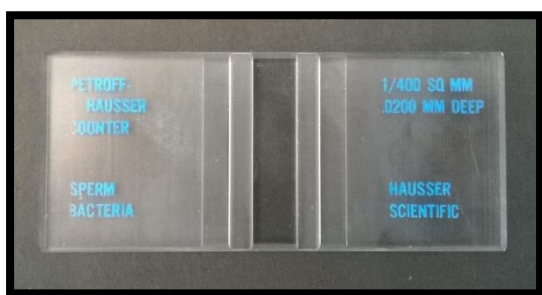
Neste estudo, a Concentração Inibitória Mínima (MIC) define-se como sendo a menor concentração de extrato capaz de inibir o crescimento bacteriano, ou seja, a concentração na qual não se observa nenhuma motilidade das espiroquetas (borrélías).

Para determinar a MIC de cada extrato após 72h, utilizou-se uma câmara de contagem de bactérias (Petroff-Hausser counter-3900) (Figura 23), e também o microscópio de fundo escuro (Figura 24) (Sicklinger *et al.*, 2003).

Efetua-se a observação da placa, com início na primeira réplica, através da contagem de espiroquetas com motilidade, no poço com a menor concentração de extrato (19,5 µg/ml).

Terminadas as contagens, procedeu-se ao cálculo da concentração de borrelíias viáveis, aplicando a fórmula correspondente à câmara de contagem de Petroff-Hausser:

$$\text{Concentração de borrelíias viáveis} = \frac{n^{\circ} \text{ de borrelíias contadas} \times \text{fator de diluição} \times 2 \times 10^7}{80}$$



**Figura 23** – Representação da câmara de Petroff-Hausser counter-3900 (foto original da autora).



**Figura 24** – Visualização e contagem de borrelíias em microscopia de fundo escuro (foto original da autora).

## 5 – DETERMINAÇÃO DE MBC

No presente trabalho, a concentração microbicida mínima (MBC) define-se como sendo a menor concentração na qual as borrelíias após serem co-cultivadas por 21 dias não apresentam crescimento em meio BSK líquido diluído 1:6 (Levin *et al.*, 1993).

Para determinar a MBC utilizaram-se todos os poços da microplaca onde já não se verificou motilidade de espiroquetas após as 72h, ou seja, a concentração da MIC e todas as concentrações imediatamente anteriores. Num microtubo de 1500 µL, adicionou-se o volume de cada poço (200 µL), contendo o extrato e as culturas de estirpes de *Borrelia* e adicionou-se também 1 mL de BSK líquido, após o que se seguiu um período de 21 dias de incubação (Figura 25) (Levin *et al.*, 1993).

Uma vez mais para garantir a reprodutibilidade do procedimento cada ensaio foi executado em triplicado para cada diluição. No final dos 21 dias de incubação observou-se uma amostra de cada microtubo ao microscópio de fundo escuro, de forma

a verificar a presença de crescimento bacteriano e motilidade das borrélias e determinar a MBC.



**Figura 25** – Foto representativa dos tubos de borrélias re-cultivadas com extrato, no final do período de incubação de 3 semanas (*foto original da autora*).

## 6 – TRATAMENTO DE DADOS

### 6.1– DETERMINAÇÃO DE MIC<sub>50</sub> E MIC<sub>90</sub>

Os índices 50 e 90 de MIC, representam a concentração necessária para inibir pelo menos 50% e 90%, respetivamente, das estirpes utilizadas. A determinação de MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub>, será obtida a partir da média dos triplicados correspondentes a cada um dos ensaios.

A MIC<sub>50</sub> é o valor correspondente de MIC na posição  $n \times 0,5$  e para MIC<sub>90</sub> é utilizada a mesma formulação, alterando apenas a posição para  $n \times 0,9$ . Sendo que para o cálculo destas variáveis é assumido que ‘n’ corresponde ao número total de estirpes e ‘y<sub>1</sub>, y<sub>2</sub>.....y<sub>n</sub>’ a série de valores de MIC, a partir da concentração mais baixa (Schwarz *et al.*, 2010).

## 7 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a apresentação dos resultados foram elaborados gráficos e tabelas, utilizando o *software* “GraphPad Prism, version 5”.

Foi avaliada a concordância entre os resultados obtidos utilizando a análise de variância (ANOVA) pelo método de *Dunnett* (Dunnett, 1955).

Este teste permite a realização de comparações múltiplas, entre um grupo controle e os restantes grupos a analisar. O parâmetro de interesse primário quando existem comparações múltiplas é a diferença entre a média de um grupo a analisar ( $\bar{y}_i$ ) e a média do grupo controle ( $\bar{y}_j$ ), em que o objetivo é testar as hipóteses. O teste de *Dunnett* é uma modificação do teste *t* de *Student*, sendo calculado a partir de:

$$d = d_{\alpha}(k, N-k) \sqrt{2 \times \frac{QME}{n}} \quad (\text{dados balanceados})$$

$$d = d_{\alpha}(k, N-k) \sqrt{QME \left( \frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j} \right)} \quad (\text{dados não balanceados})$$

Em que  $d_{\alpha}(k, N-k)$  é um valor tabelado proposto por *Dunnett*, que depende do número de níveis ( $k$ ) e dos graus de liberdade dos erros ( $N-k$ ), e QME corresponde ao quadrado médio para o erro experimental.

Se considerarmos o nível de significância em 5% e o nível  $j$  como controle, rejeitamos a igualdade entre a média do nível  $i$  e a média do nível  $j$  se:

$$|\bar{y}_i - \bar{y}_j| > d.$$

Assim, com um valor de  $\rho < 0,05$  rejeita-se a existência de igualdade entre as médias (Portalaction, 2016).

### **III - RESULTADOS**

Dos extratos testados, todos exibiram atividade antimicrobiana contra todas as estirpes em estudo, sendo aquela avaliada a partir da perda de motilidade das espiroquetas observada em cada diluição de cada um dos extratos utilizados.

## 1- OBSERVAÇÃO DAS MICROPLACAS

6x2-105 R 51a (SM116)

43



## 2 - COMPARAÇÃO ENTRE OS VALORES DE MIC, MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub>, VIABILIDADE A 10% e 50% e MBC

O valor mais baixo de MIC encontrado para os extratos aquosos (EDY1 e PR1) foi de 5000 µg/mL para a espécie *Eugenia dysenterica* e de 2500 µg/mL para a espécie *Pouteria ramiflora*. Para os extratos etanólicos (EDY2 e PR2) o valor de MIC foi de 312,5 µg/mL e 625 µg/mL, respetivamente (Tabela 4).

Para o extrato EDY1 os valores de MIC variaram de 5000 - 10000 µg/mL, sendo que para Pbi (*B. bavariensis*) só foi verificada ausência de motilidade na concentração mais elevada (10000 µg/mL).

O extrato EDY2, por sua vez, apresentou o melhor desempenho microbicida, eficaz contra todas as estirpes de borrelías utilizadas, com valores de MIC que se situaram entre 312,5 e 1250 µg/mL. Contra *B. afzelii* o referido extrato revelou uma eficácia de 312,5 µg/mL.

No caso do extrato PR1 apenas foi observada atividade antimicrobiana contra três estirpes (B31, Pbi Japão e Pbi), tendo a MIC apresentado valores entre 2500 e 10000 µg/mL, sendo que para as espiroquetas da estirpe Pbi este extrato só mostrou eficácia na concentração de 10000 µg/mL.

Finalmente, o extrato PR2 mostrou ser bastante eficaz tal como verificado em EDY2. Os valores de MIC variaram de 625 – 2500 µg/mL, com eficácia superior para a estirpe PGau (*B. afzelii*) com um valor de MIC de 625 µg/mL.

**Tabela 4 – Valores de MIC dos quatro (4) extratos testados para as estirpes do complexo *B. burgdorferi* s.l..**

	Espécies (Estirpes) de <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.			
	<i>B. burgdorferi</i> s.s. (B31)	<i>B. garinii</i> (Pbi Japão)	<i>B. bavariensis</i> (Pbi)	<i>B. afzelii</i> (PGau)
Extratos	[ ] µg/mL	[ ] µg/mL	[ ] µg/mL	[ ] µg/mL
EDY1	5000	5000	10000	5000
EDY2	1250	1250	1250	312,5
PR1	2500	5000	10000	>10000
PR2	2500	2500	1250	625

A partir dos valores de MIC obtidos na Tabela 4, foi possível determinar a MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> para as borrelíias do complexo *B. burgdorferi* s.l. estudadas.

Os extratos aquosos comportaram-se de forma muito semelhante, pois para o extrato de *Eugenia dysenterica* (EDY1) a MIC que elimina 50% e 90% das estirpes de *Borrelia* estudadas são 5000 e 10000 µg/mL, respetivamente, tendo-se verificado o mesmo para o extrato aquoso da planta, *Pouteria ramiflora* (PR1), para o qual a MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> correspondeu a 5000 e >10000 µg/mL, respetivamente (Tabela 5).

Os extratos etanólicos comportaram-se de forma semelhante entre si, o extrato de *Eugenia dysenterica* (EDY2) obteve como MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> o valor de 1250 µg/mL e o extrato etanólico de *Pouteria ramiflora* (PR2) obteve 1250 e 2500 µg/mL como MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub>, respetivamente.

**Tabela 5 - Valores de MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> dos quatro (4) extratos testados para as estirpes do complexo *B.burgdorferi* s.l.**

Estirpes de <i>B.burgdorferi</i> s.l.			
	Intervalo	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>
Extratos	[ ] µg/mL	[ ] µg/mL	[ ] µg/mL
EDY1	[19,5 - 10000]	5000	10000
EDY2	[19,5 - 10000]	1250	1250
PR1	[19,5 - 10000]	5000	>10000
PR2	[19,5 - 10000]	1250	2500

A partir da contagem de espiroquetas (borrelíias) viáveis em cada concentração de extrato utilizada, foi possível determinar a concentração necessária para eliminar 50% e 90% da população de borrelíias estudadas, tendo em conta o inóculo inicial de borrelíias adicionado ( $1 \times 10^7$ ). A viabilidade a 50% correspondeu a um valor de  $5 \times 10^6$  espiroquetas/ mL e a 10% correspondeu a um valor de  $1 \times 10^6$  espiroquetas/ mL.

Assim, no que respeita a avaliação da estirpe B31 de *B. burgdorferi* s.s., tendo em conta os extratos etanólicos, uma vez que demonstraram uma melhor eficácia, para o extrato

de *Eugenia dysenterica* (EDY2) foi apenas necessária uma concentração de 19,5 µg/mL para eliminar 50%, e 625 µg/mL para eliminar 90% das borrélias (Tabela 6), porém, como já referido anteriormente (Tabela 4), para a eliminação total foi necessária uma concentração de 1250 µg/mL. Para o extrato de *Pouteria ramiflora* (PR2), os valores de concentração foram um pouco mais elevados comparativamente ao extrato anterior, pelo que para eliminar 50% das borrélias foram necessários 312,5 µg/mL de extrato e para 90% foi necessária uma concentração de 2500 µg/mL.

Quanto à estirpe Pbi Japão de *B. garinii*, para o extrato EDY2 foi exigida uma concentração de 312,5 µg/mL para eliminar 50% e de 625 µg/mL para eliminar 90% das borrélias, contudo, para uma eliminação total foi necessária uma concentração de 1250 µg/mL. No que respeita ao extrato PR2, para eliminar 50% foram necessários apenas 19,5 µg/mL de extrato enquanto que para 90% foi necessária uma concentração bastante mais elevada, isto é, 1250 µg/mL (Tabela 6).

**Tabela 6 – Concentração de extrato necessária para eliminar 50% e 90% da população de borrélias estudadas (*B. burgdorferi* s.s. e *B. garinii*).**

	<i>B. burgdorferi</i> s.s.			<i>B. garinii</i>		
	Intervalo	Viabilidade		Intervalo	Viabilidade	
Extratos	[ ] µg/mL	10%	50%	[ ] µg/mL	10%	50%
EDY1	[19,5 - 10000]	1250	1250	[19,5 - 10000]	2500	1250
EDY2	[19,5 - 10000]	625	19,5	[19,5 - 10000]	625	312,5
PR1	[19,5 - 10000]	1250	625	[19,5 - 10000]	2500	625
PR2	[19,5 - 10000]	1250	312,5	[19,5 - 10000]	1250	19,5

Quanto à avaliação da estirpe Pbi de *B. bavariensis*, nomeadamente para a concentração necessária para eliminar 50% e 90% de borrélias, foi possível observar que, para o extrato EDY2 foi exigida uma concentração de 625 µg/mL para as duas variáveis, já para uma eliminação total foi necessário o dobro da concentração (1250 µg/mL) (Tabela 7). Por sua vez, para o extrato PR2, para eliminar 50% das borrélias foram necessários apenas 312,5 µg/mL de extrato, enquanto que para 90% foi necessário o dobro da concentração (625 µg/mL).

Finalmente, em relação à estirpe PGau de *B. afzelii*, o extrato EDY2 demonstrou uma melhor eficácia, mostrando valores de concentração de 78,1 µg/mL e 156,3 µg/mL para a eliminação de 50% e 90% das borrélias, respectivamente (Tabela 7), valor muito similar à MIC anteriormente encontrada (312,5 µg/mL). Por fim para o extrato PR2, foi necessário que o mesmo fosse utilizado numa concentração de 312,5 µg/mL e 625 µg/mL para eliminar 50 e 90% das borrélias (respectivamente).

**Tabela 7 – Concentração de extrato necessária para eliminar 50% e 90% da população de borrélias estudadas (*B. bavariensis* e *B. afzelii*).**

	<i>B. bavariensis</i>			<i>B. afzelii</i>		
	Intervalo	Viabilidade		Intervalo	Viabilidade	
Extratos	[ ] µg/mL	10%	50%	[ ] µg/mL	10%	50%
EDY1	[19,5 - 10000]	5000	5000	[19,5 - 10000]	2500	2500
EDY2	[19,5 - 10000]	625	625	[19,5 - 10000]	156,3	78,1
PR1	[19,5 - 10000]	5000	2500	[19,5 - 10000]	10000	5000
PR2	[19,5 - 10000]	625	312,5	[19,5 - 10000]	625	312,5

Ao avaliar a atividade bactericida, após os 21 dias de incubação, para a estirpe B31 (*B. burgdorferi* s.s.) foi possível verificar que apenas existiu variação entre a MIC e MBC para o extrato EDY1, uma vez que, o valor de MBC aumentou para 5000 µg/mL.

Para a estirpe Pbi Japão (*B. garinii*) os extratos etanólicos de ambas as plantas evidenciaram um valor de MBC diferente do valor de MIC, 10000 µg/mL e 5000 µg/mL para a espécie *Eugenia dysenterica* e *Pouteria ramiflora*, respectivamente.

Na estirpe Pbi (*B. bavariensis*) o valor de MBC foi superior ao de MIC em todos os extratos com exceção do extrato PR1, que manteve o valor correspondente à maior concentração utilizada.

Para a estirpe PGau (*B. afzelii*), o valor de MBC foi superior ao da MIC obtida anteriormente, em todos os extratos.

Na avaliação de Pbi (*B. bavariensis*) o extrato EDY1 não demonstrou atividade bactericida, o mesmo acontecendo para o extrato PR1 contra espiroquetas da espécie *B. afzelii* (PGau), uma vez que também não evidenciou atividade inibitória.

Foi também possível verificar que os valores de MBC em todos os ensaios não variaram significativamente, oscilando entre 1250 e 10000 µg/mL (Tabela 8).

**Tabela 8 – Valores de MBC dos quatro (4) extratos testados para as estirpes do complexo *B. burgdorferi*.s.l.**

	Espécies (Estirpes) de <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.			
	<i>B. burgdorferi</i> s.s. (B31)	<i>B. garinii</i> (Pbi Japão)	<i>B. bavariensis</i> (Pbi)	<i>B. afzelii</i> (PGau)
<b>Extratos</b>	[ ] µg/mL	[ ] µg/mL	[ ] µg/mL	[ ] µg/mL
EDY1	5000	5000	NC	10000
EDY2	1250	10000	2500	1250
PR1	5000	5000	10000	>10000
PR2	2500	5000	2500	2500

NC – Não Conclusivo

### 3 - COMPARAÇÃO ENTRE EXTRATOS E ESPÉCIE ESTUDADOS

Na Tabela 9 é possível observar os valores de MIC correspondentes à interação entre as estirpes em estudo e o controlo positivo, a doxiciclina.

Para a estirpe B31 de *B. burgdorferi* s.s., o valor de MIC foi de 39,1 µg/mL, e para as estirpes de Pbi Japão (*B. garinii*), Pbi (*B. bavariensis*) e PGau (*B. afzelii*) os valores de MIC mostraram um decréscimo para cerca de metade do valor anterior (19,5 µg/mL).

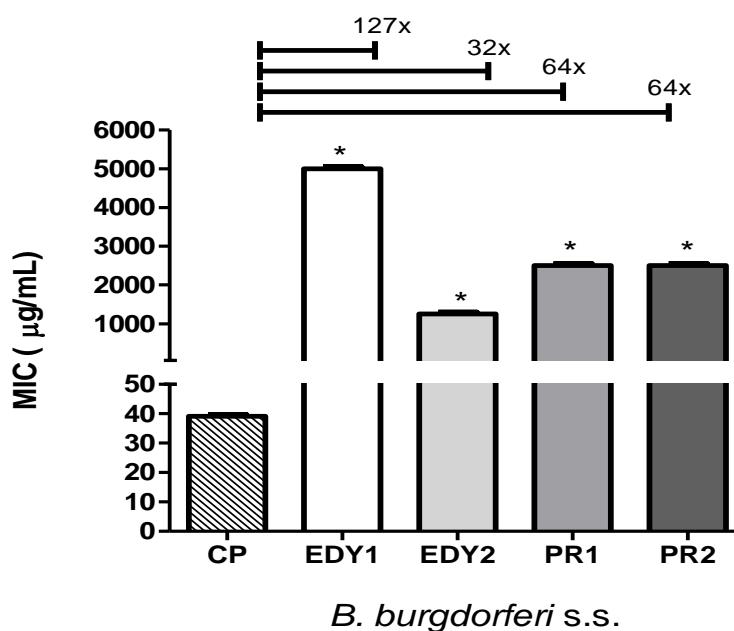
**Tabela 9 - Valores de MIC referentes à doxiciclina sobre as espécies de *B. burgdorferi* s.l.**

	Espécies (Estirpes) de <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.			
	<i>B. burgdorferi</i> s.s. (B31)	<i>B. garinii</i> (Pbi Japão)	<i>B. bavariensis</i> (Pbi)	<i>B. afzelii</i> (PGau)
<b>Controlo positivo (CP)</b>	[ ] µg/mL	[ ] µg/mL	[ ] µg/mL	[ ] µg/mL
Doxiciclina	39,1	19,5	19,5	19,5

Ao comparar-se a interação das estirpes/extratos e a interação das mesmas em relação à doxíciclina (CP) foi possível observar que a concentração dos extratos que apresentam na sua composição fitocomplexos com ação antimicrobiana, foram muito superiores à concentração de doxíciclina necessária para se obter um efeito inibitório antimicrobiano equivalente, uma vez que a doxíciclina é uma substância isolada com uma MIC já descrita na literatura. Estes resultados estão demonstrados nas figuras 27 a 30.

Assim, perante a estirpe B31 de *B. burgdorferi* s.s. o extrato EDY1 exigiu uma concentração 127 vezes superior à da doxíciclina, para que se obtivesse um efeito antimicrobiano. Em contrapartida para o extrato EDY2 foi necessária uma concentração apenas 32 vezes superior para o mesmo efeito (Figura 27).

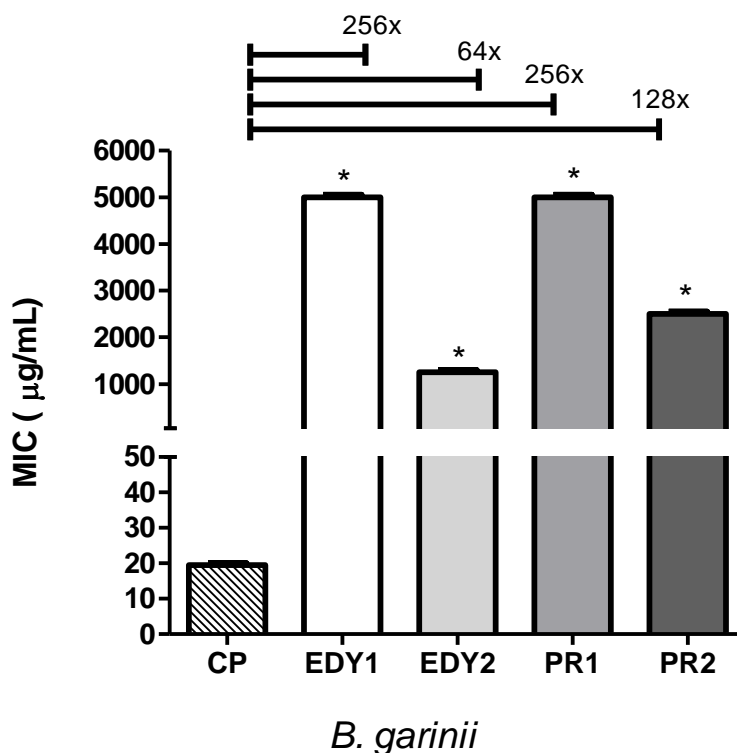
No caso dos extratos PR1 e PR2 da espécie *Pouteria ramiflora*, foi necessário utilizar uma concentração 64 vezes superior à da doxíciclina (Figura 27).



**Figura 27** – Representação gráfica da comparação dos valores de MIC correspondentes à estirpe B31 de *B. burgdorferi* s.s. contra os extratos EDY1, EDY2, PR1 e PR2 em relação à MIC do controlo positivo (doxíciclina). Análise de Variância (ANOVA) de uma via com pós-teste de *Dunnett* revelaram diferenças estatísticas significativas de  $*p < 0,0001$  em relação ao grupo controlo positivo (CP) MIC (doxíciclina) 39,1 µg/mL. Os resultados de MIC foram expressos em µg/mL e representam a média  $\pm$  DP de três ensaios independente. CP – Controlo positivo.

Como se observa na Figura 28 para a espécie *B. garinii*, os extratos EDY1 e EDY2 exigiram uma concentração 256 e 64 vezes superior à da doxiciclina, respetivamente.

Em relação aos extratos PR1 e PR2, foi necessária uma concentração de 256 e 128 vezes mais elevada, respetivamente, do que aquela utilizada no controlo.

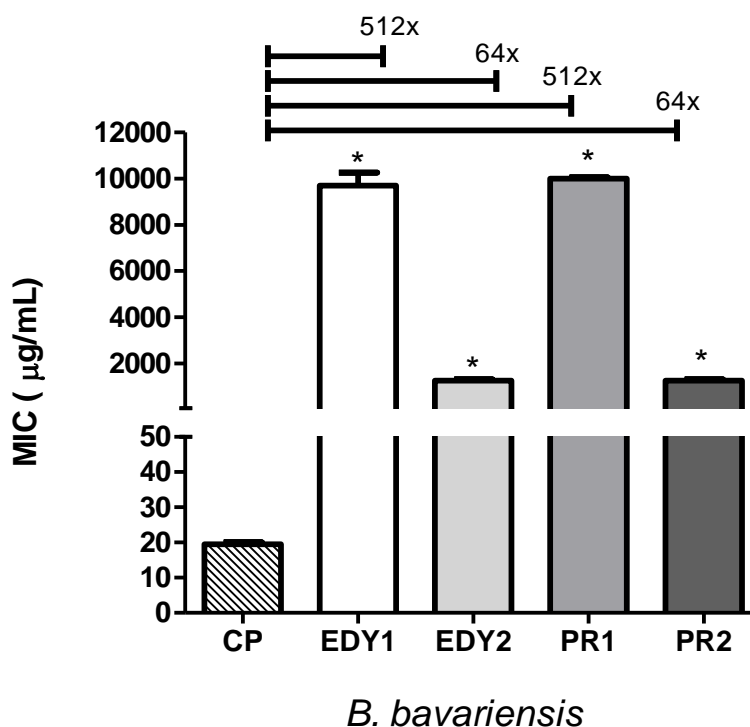


**Figura 28** - Representação gráfica da comparação dos valores de MIC correspondentes à estirpe Pbi Japão de *B. garinii* contra os extratos EDY1, EDY2, PR1 e PR2 em relação à MIC do controlo positivo (doxiciclina). Análise de Variância (ANOVA) de uma via com pós-teste de *Dunnnett* revelaram diferenças estatísticas significativas de  $*p < 0,0001$  em relação ao grupo controlo positivo MIC (doxiciclina) 19,5 µg/mL. Os resultados de MIC foram expressos em µg/mL e representam a média  $\pm$  DP de três ensaios independentes. CP – Controlo positivo.

Para a estirpe Pbi (*B. bavariensis*), os extratos EDY1 e EDY2, necessitaram de estar 512 e 64 vezes mais concentrados, respetivamente, do que a doxiciclina (Figura 29).

No caso dos extratos da espécie *Pouteria ramiflora*, PR1 e PR2, estes exigiram uma concentração 512 e 64 vezes superior, respetivamente, comparativamente ao controlo (Figura 29).

Da observação de todos os resultados obtidos para esta estirpe foi possível notar que ambos os extratos se comportaram de igual forma.

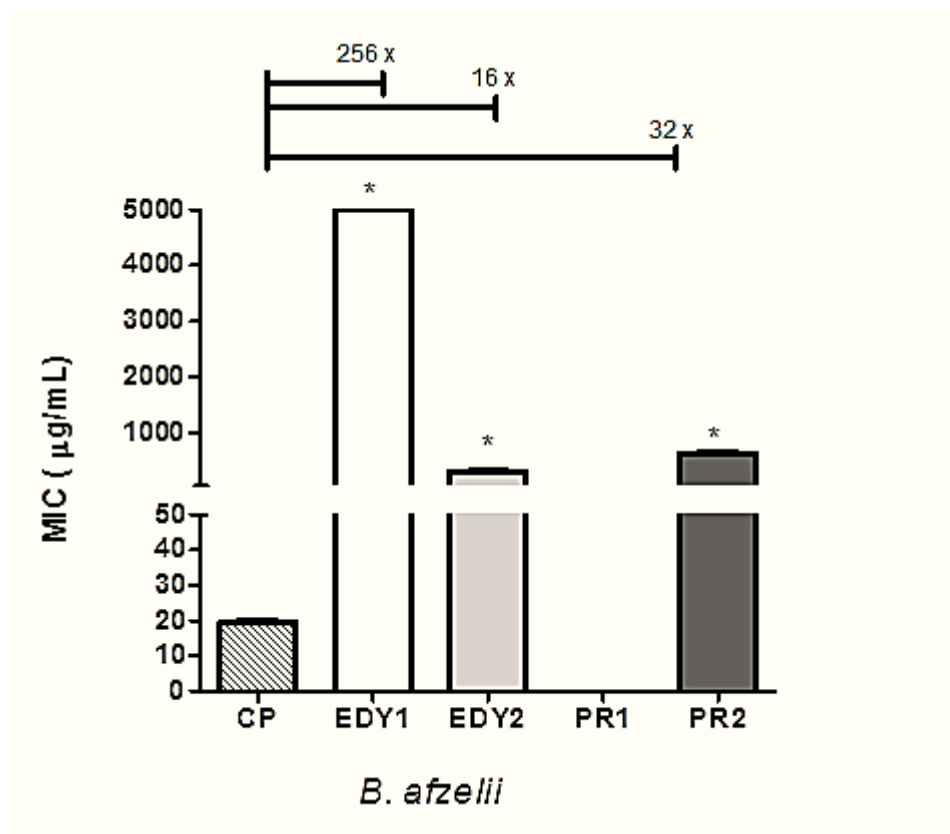


**Figura 29** – Representação gráfica da comparação dos valores de MIC correspondentes à estirpe Pbi de *B. bavariensis* contra os extratos EDY1, EDY2, PR1 e PR2 em relação à MIC do controlo positivo (doxiciclina). Análise de Variância (ANOVA) de uma via com pós-teste de *Dunnett* revelaram diferenças estatísticas significativas de  $*p < 0,0001$  em relação ao grupo controlo positivo MIC (doxiciclina) 19,5 µg/mL. Os resultados de MIC foram expressos em µg/mL e representam a média  $\pm$  DP de três ensaios independentes. CP – Controlo positivo.



Por último, contra a estirpe PGau (*B. afzelii*) os extratos da espécie *Eugenia dysenterica*, EDY1e EDY2, necessitaram respetivamente, de concentrações de 256 e 16 vezes mais elevadas do que a doxiciclina (Figura 30).

Perante os extratos da espécie *Pouteria ramiflora*, em PR1 não foram obtidos resultados, e para o extrato PR2 foi necessário que o mesmo estivesse 32 vezes mais concentrado para a obtenção do efeito antimicrobiano (Figura 30).



**Figura 30 - Representação gráfica da comparação dos valores de MIC correspondentes à estirpe PGau de *B. afzelii* contra os extratos EDY1, EDY2, PR1 e PR2 em relação à MIC do controlo positivo (doxiciclina).** Análise de Variância (ANOVA) de uma via com pós-teste de *Dunnnett* revelaram diferenças estatísticas significativas de  $*p < 0,0001$  em relação ao grupo controlo positivo MIC (doxiciclina) 19,5 µg/mL. Os resultados de MIC foram expressos em µg/mL e representam a média  $\pm$  DP de três ensaios independentes. CP – Controlo positivo.

Na análise estatística efetuada pelo teste de *Dunnnett*, obteve-se um valor de  $p < 0,0001$ , o que revelou diferenças estatisticamente significativas, entre os dois grupos, neste caso entre o controlo positivo e os diferentes extratos testados.

## **IV – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**

## IV – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os antimicrobianos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou provocar a morte de bactérias. O grande marco para o tratamento das infecções bacterianas ocorreu com Alexander Fleming ao descobrir a penicilina. Apenas anos mais tarde, outras substâncias foram descobertas, através de triagens de produtos naturais microbianos (Guimarães *et al.*, 2010). Os antimicrobianos possuem duas classificações quanto à sua origem: natural e sintética ou derivados semi-sintéticos. Os antimicrobianos de origem natural e derivados semi-sintéticos constituem a maioria de uso clínico:  $\beta$ -lactâmicos, tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, peptídicos cíclicos, estreptograminas. Por sua vez, os de origem sintética compreendem as sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas (Guimarães *et al.*, 2010).

Atualmente para as mais variadas doenças infecciosas de origem bacteriana são prescritos antimicrobianos, que na maioria das vezes se tornam nefastos para o organismo e cada vez com mais frequência surgem resistências. Portanto torna-se importante refletir sobre a importância dos compostos bioativos presentes nas plantas e no grande potencial para o desenvolvimento de novas substâncias para uso terapêutico, que sejam sinónimo de saudável, seguro e benéfico (Vieira *et al.*, 2008), e foi a pensar nessa perspectiva que o presente trabalho foi desenvolvido.

Para o tratamento da Borreliose de Lyme (BL), os antimicrobianos usados têm como mecanismo de ação a inibição da síntese proteica das borrelíias. Os medicamentos mais prescritos incluem assim, a doxiciclina, amoxicilina e ceftriaxona. Devido ao elevado tempo de administração do medicamento (até 30 dias), por vezes ocorrem efeitos secundários, como a toxicidade hepática. De forma a poder existir uma alternativa terapêutica natural para o tratamento da BL, surgiu este desafio de se testarem extratos provenientes do Brasil, uma vez que é um país detentor de uma flora riquíssima.

Com os resultados obtidos na realização dos ensaios de suscetibilidade dos extratos, é de assinalar que existem algumas variações no perfil de sensibilidade das espécies do complexo *B. burgdorferi* s.l. em relação ao antimicrobiano utilizado como controlo positivo (doxiciclina), uma vez que, se tratam de espécies utilizadas na rotina do

laboratório e algumas podem ter adquirido perfis de sensibilidade ou de resistência devido às repicagens múltiplas a que são sujeitas.

Os valores de MIC determinados para os extratos testados, foram bastante elevados em relação à doxícliclina, uma vez que nos encontramos perante extratos brutos de plantas, que são constituídos por uma mistura complexa de vários compostos orgânicos. Portanto é assim necessária uma concentração superior à que é utilizada para um antimicrobiano, tratando-se de uma substância química pura, fabricada especialmente para o efeito. Esta condição foi verificada em 2011, por Liebold e colaboradores ao testarem extratos das raízes de plantas da espécie *Dipsacus sylvestris* contra *B. burgdorferi* s.s., utilizando como controlo a amoxicilina (Liebold *et al.*, 2011).

Perante as concentrações inibitórias mínimas obtidas e avaliando de forma geral o desempenho dos presentes extratos contra as espécies de referência de *B. burgdorferi* s.l., foi possível verificar que todos exibiram atividade antimicrobiana contra todas as espécies incluídas no presente estudo, à exceção do extrato aquoso de *Pouteria ramiflora*, que nas concentrações utilizadas não demonstrou ser eficiente na inibição total da espécie *B. afzelii*. De entre os extratos etanólicos e aquosos, os primeiros mostraram-se mais eficazes contra as espécies de referência em estudo, destacando-se o extrato obtido da espécie *Eugenia dysenterica*. De uma forma geral a espécie *B. bavariensis* demonstrou ser a mais resistente, uma vez que apresentou valores de MIC mais elevados, enquanto que a espécie *B. afzelii*, apesar de apenas ter sido inibida por três extratos, demonstrou ser a mais sensível, uma vez que apresentou valores inferiores de MIC.

Hoje em dia, já é conhecida a existência de centenas de compostos bioativos presentes em cada planta, que atuam em sinergismo e conferem uma vasta variedade de bioatividade (Martins *et al.*, 2015). Portanto é de realçar que as diferenças que foram evidenciadas de espécie para espécie podem ser explicadas pelo facto de os extratos testados apresentarem diferentes compostos bioativos que reagem de forma diferente dependendo do microrganismo.

Analisando os valores de MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> obtidos, mais uma vez foi possível verificar que o extrato etanólico da espécie *Eugenia dysenterica* (EDY2) se destacou perante

todas as estirpes das diferentes espécies de *Borrelia* uma vez que, apresentou concentrações inibitórias mais baixas para 50% e 90% das estirpes de borrelíias. Embora o extrato etanólico de *Pouteria ramiflora* (PR2) se tenha comportado de forma semelhante ao anterior, apresentou mesmo assim, algumas diferenças.

Os resultados obtidos para as concentrações bactericidas mínimas (MBC) voltaram a evidenciar os extratos EDY2 e PR2, com especial atenção, uma vez mais, para o primeiro, apesar da eficácia do EDY2 contra a espécie *B. garinii* ter exigido uma concentração mais elevada.

A procura de atividade antimicrobiana em extratos vegetais face a estirpes de espécies do complexo *B.burgdorferi* s.l foi iniciada por Brorson e colaboradores em 2007 que demonstraram a atividade de extratos de sementes de uva contra a espécie *B. afzelii*. Em 2011, Liebold e colaboradores também comprovaram a eficácia de extratos apolares de raízes da planta *Dipsacus sylvestris* face à espiroqueta *B. burgdorferi* s.s.. Recentemente outros autores apostaram em 15 fitoquímicos contra as espécies *B. burgdorferi* s.s. e *B. garinii*, tendo sido demonstrada a eficácia de dois deles (baicaleína e monolaurina) contra três (3) formas morfológicas (espiroquetas, formas latentes arredondadas e biofilme) (Brorson *et al.*, 2007; Liebold *et al.*, 2011; Goc *et al.*, 2015). Até à data não se conhecem mais estudos realizados no âmbito da utilização de extratos vegetais com ação antimicrobiana contra as referidas espiroquetas.

Importa, no entanto, referir que muitos estudos foram realizados, utilizando uma grande diversidade de plantas, o que permitiu a identificação de moléculas bioativas, e respetivas propriedades e mecanismos de ação (Martins *et al.*, 2015). As plantas sintetizam uma enorme diversidade de metabólitos, que apresentam a sua classificação de acordo com a função que desempenham. Os metabólitos primários são fundamentais para o crescimento e desenvolvimento da planta, sendo que, os metabólitos secundários, têm o papel de garantir a sobrevivência da mesma (Miranda *et al.*, 2013). Os fitocompostos, são assim substâncias com origem em metabólitos primários ou secundários (ou ambos) dos extratos das plantas, responsáveis em conjunto, pelos efeitos biológicos de uma planta medicinal ou dos seus derivados (ANVISA, 2014).

A planta da espécie *Pouteria ramiflora* já possui estudos realizados, tendo sido utilizados extratos etanólicos provenientes das suas folhas (o mesmo que foi utilizado no presente estudo), que demonstraram atividade neuro protetora contra danos oxidativos (Costa *et al.*, 2013) e também atividade inibitória da tirosinase, enzima responsável pela síntese de melanina (Souza *et al.*, 2012 b). Quanto a componentes químicos, ainda não foram descritos para esta planta, portanto são necessários mais estudos abrangendo essa componente.

Ao contrário da espécie anterior, a planta *Eugenia dysenterica* é a mais utilizada como alvo de investigação e já foram realizados inúmeros estudos com os quais já se comprovaram as mais distintas atividades. Em trabalhos realizados com os extratos das suas folhas foram identificadas várias atividades biológicas tais como: atividade antidiarreica, atividade contra diabetes e icterícia (Silva *et al.*, 2001), efeito antifúngico contra *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* (Costa *et al.*, 2000; Correia *et al.*, 2016), efeito gastroprotetor associado a úlceras (Prado *et al.*, 2014), atividade inibitória da alfa-amilase e alfa-glucosidase (Souza *et al.*, 2012 a), atividade antiviral contra rotavírus, associados a diarreias severas (Cecílio *et al.*, 2012) e ainda a presença de atividade antioxidante (Prado *et al.*, 2014). Em consequência, alguns componentes químicos desta planta já foram descritos, sendo eles: taninos, flavonóides, catequinas, ácido gálico, sesquiterpenos e componentes voláteis como os óleos essenciais ( $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno, limoneno,  $\alpha$ -tujeno,  $\alpha$ -terpineol e óxido de  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -pineno, (Z) - $\beta$ -ocimeno, (E) - $\beta$ -ocimeno e  $\gamma$ -cadineno) (Costa *et al.*, 2000; Duarte *et al.*, 2004; Cecílio *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2012 b).

Os flavonóides constituem um grupo de pigmentos vegetais muito importante, uma vez que protegem as plantas contra infecções bacterianas e fúngicas. Esta condição pode ser explicada pelo facto dos flavonóides possuírem a capacidade de formar um complexo com as proteínas solúveis extracelulares e com a parede celular, ou então, pode ter a ver com o seu carácter lipofílico, que leva à rutura da membrana celular (Miranda *et al.*, 2013).

Neste trabalho, pela observação das microplacas, foi possível constatar a existência de aglomerados de espiroquetas, algo que é corroborado pela evidência de que os

flavonóides, levam à ocorrência de efeito agregante nas células bacterianas, o que promove a formação de agregados, resultando assim na diminuição de oxigénio interrompendo a cadeia de electrões. Esta interrupção leva assim, a que ocorra diminuição de nutrientes essenciais (uridina, timidina) para a síntese de ácidos nucleicos (Nogueira, 2012). Na presença de taninos também foi demonstrada atividade citotóxica antiviral e antibacteriana (Vieira *et al.*, 2012).

Em estudos anteriores, nomeadamente levados a efeito por Brorson *et al* e Goc *et al.*, foi também referida a possível atividade antimicrobiana dos flavonóides com grupos fenólicos, uma vez que, a baicaleína (flavonóide) testada contra *Staphylococcus aureus* promove um aumento da permeabilidade da membrana bacteriana, inibindo a síntese proteica e afetando diversas atividades importantes, nomeadamente a atividade da topoisomerase I e II (Brorson *et al.*, 2007; Goc *et al.*, 2015).

Mecanismos idênticos aos flavonóides e aos taninos podem ser propostos, mas são ainda necessários mais trabalhos de investigação ao nível da análise fitoquímica dos extratos.

São ainda de referir outros estudos que demonstraram que plantas da mesma espécie, embora com diferentes origens podem ser consideradas diferentes na sua composição química, e possivelmente possuir diferente eficácia e potência do(s) composto(s) bioativo(s) (Martins *et al.*, 2015).

Assim, uma possível explicação para a eficácia dos extratos face às espécies do complexo *B.burgdorferi* s.l., poderá passar pela presença de compostos ativos (possivelmente flavonóides e taninos), que agem sinergicamente, com efeitos diretos ou indiretos. Os efeitos diretos estão relacionados com a sua ação farmacológica, enquanto que os efeitos indiretos estão associados a interações simultâneas com outras plantas ou fármacos (Martins *et al.*, 2015). No entanto, é necessário aprofundar os estudos existentes nesse sentido, uma vez que a atividade evidenciada nos extratos pode depender de um único princípio ativo ou do conjunto de várias substâncias, algo que demonstraria uma ação sinérgica entre os metabólitos (Miranda *et al.*, 2013).

Com este trabalho, apesar de preliminar, admite-se poder concluir que os extratos das plantas das espécies *Eugenia dysenterica* e *Pouteria ramiflora* provenientes do Cerrado Brasileiro possuem compostos bioativos com atividade antimicrobiana contra espécies do complexo *B. burgdorferi* s.l..

A atividade dos extratos etanólicos, destaca-se em relação aos aquosos, uma vez que, além de apresentarem efeitos inibitórios em menores concentrações, demonstraram um melhor espectro de ação, ao inibir todas as estirpes das espécies de *Borrelia* em estudo.

Os quatro (4) extratos testados devem, assim, ser investigados com o objetivo de isolar e/ou caracterizar compostos bioativos que fundamentem o efeito antimicrobiano contra as diferentes espécies de *Borrelia*, bem como descrever os seus possíveis mecanismos de ação e avaliar a sua atividade *in vivo*.

A realização deste estudo enquanto abordagem pioneira, envolvendo os referidos extratos vegetais *versus* espiroquetas do complexo *B. burgdorferi* s.l., permitiu refletir sobre uma possível alternativa para a terapêutica que atualmente é utilizada para a Borreliose de Lyme, considerando os resultados obtidos os quais se mostraram muito promissores, abrindo boas perspectivas terapêuticas a curto/médio prazo.



## **V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AdvanceCare, (2016). *Paralisia de Bell*. [online] Disponível em: <https://advancecare.pt/glossary/paralisia-bell/> [Acedido em 02-08-16].

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2014). *Dispõe sobre o registo de medicamentos fitoterápicos e o registo e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos*. RDC nº 26 [pdf] Brasília: Anvisa, pp. 34. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc0026\\_13\\_05\\_2014.pdf/d6e5b9d7-dc13-46ce-bfaa-6af74e8a2703](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc0026_13_05_2014.pdf/d6e5b9d7-dc13-46ce-bfaa-6af74e8a2703) [Acedido em 30-09-2016].

Aguero-Rosenfeld, M. E., Wang, G., Schwartz, I. and Wormser, G. P. (2005) Diagnosis of Lyme Borreliosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 18 (3): 484-509.

American Lyme Disease Foundation (ALDF), (2016). *Lyme Disease*. [online] Disponível em: <http://www.aldf.com/lyme-disease/> [Acedido em 26-07-2016].

Araújo, F. M., Ferreira, L. G. and Arantes, A. E. (2012) Distribution patterns of burned areas in the Brazilian Biomes: Na analysis based on satellite data for the 2002-2010 period. *Remot Sensing*, 4 (7): 1929-1946.

ATCC. (2016). *Borrelia burgdorferi* (ATCC® 35210™). [pdf] Manassas: ATCC, pp.2. Disponível em: <https://www.atcc.org/~ps/35210.ashx> [Acedido em 13-08-2016].

Barbour, A. C. and Hayes, S. F. (1986) Biology of Borrelia Species. *Microbiological Reviews*, 50 (4): 381- 400.

Biologo, (2009). *Plantas do Cerrado, Cagaita*. [online] Disponível em: <http://www.biologo.com.br/plantas/cerrado/cagaita.html> [Acedido em 07-07-2016].

Borchers, A. T., Keen, C. L., Huntley, A. C. and Gershwin, M. E. (2015) Lyme disease: A rigorous review of diagnostic criteria and treatment. *Journal of Autoimmunity*, 57: 82-115.

Brorson, O., Brorson, S. H., Scythes, J., MacAllister, J., Wier, A. and Margulis, L. (2007) Grapfruit seed extract is a powerful in vitro agent against motile and cystic forms of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Infection*, 35: 206-208.

Burgdorfer, W., Barbour, A. G., Hayes, S. F., Benach, J. L., Grunwaldt, E. and Davis, J. P. (1982) Lyme Disease – A tick-borne spirochetosis? *Science*, 216: 1317-1319.

Sicklinger, M., Wienecke, R. and Neubert, U. (2003) In vitro susceptibility testing of four antibiotics against *Borrelia burgdorferi*: a comparison of results for the three genospecies *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, and *Borrelia burgdorferi* Sensu Stricto. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(4): 1791-1793.

Cecílio, A. B., Faria, D. B., Oliveira, P. C., Caldas, S., Oliveira, D. A., Sobral, M. E. G., Duarte, M. G. R., Moreira, C. P. S., Silva, C. G. and Almeida, V. L. (2012) Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavírus. *Journal of Ethnopharmacology*, 141: 975-981.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), (2015). *Lyme Disease: Understanding the Immunoblot Test*. [online] Disponível em: <http://www.cdc.gov/lyme/diagnostesting/labtest/twostep/westernblot/index.html> [Acedido em 26-07-2016].

Cerratinga, (2016). *Cagaita (Eugenia dysenterica)*. [online] Disponível em: <http://www.cerratinga.org.br/cagaita/> [Acedido em 07-07- 2016].

Cerradonline, (2009). *Curriola [Pouteria ramiflora (Sapotaceae)]*. [online] Disponível em: <http://cerradonline.blogspot.pt/2009/01/curriola-pouteria-ramiflora-sapotaceae.html> [Acedido a 07-07- 2016].

CLSI. (2002). *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts M27-A2*. 2º ed. [pdf] Pennsylvania: CSLI, pp. 30. Disponível em <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:UbSQ6BuDmfYJ:https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html%3Fid%3D55b324fe5e9d97d2638b45b8%26assetKey%3DAS%253A273819233652736%25401442295000257+&cd=1&hl=pt-PT&ct=clnk&gl=pt> [Acedido em 13-08-2016].

Colecionandofrutas, (2016). *Pouteria ramiflora*. [online] Disponível em: <http://www.colecionandofrutas.org/pouteriaramiflora.htm> [Acedido em 07-07-2016].

Collares-Pereira, M. and Franca, I. (2000) Borreliose de Lyme: Ocorrência em Portugal. *Sociedade Portuguesa de Dermatologia e Venereologia*, 58: 107-117.

Collares-Pereira, M., Couceiro, S., Franca, I., Kurtenbah, K., Schafer, S. M., Vitorino, L., Gonçalves, L., Baptista, S., Vieira, M. L. and Cunha, C. (2004) First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (3): 1316-1318.

Correia, A. F., Silveira, D., Fonseca-Bazzo, Y. M., Magalhães, P. O., Fagg, C. W., Silva, E. C., Gomes, S. M., Gandolfi, L., Pratesi, R. and Nóbrega, Y. K. M. (2016) Activity of crude extracts from Brazilian cerrado plants against clinically relevant *Candida* species. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16: 1-9.

Costa, T. R., Fernandes, O. F. L., Santos, S. C., Oliveira, C. M. A., Lião, L. M., Ferri, P. H., Paula, J. R., Ferreira, H. D., Sales, B. H. N. and Silva, M. R. R. (2000) Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. *Journal of Ethnopharmacology*, 72: 111-117.

Costa, A. V., Calábria, L. K., Furtado, F. B., Gouveia, N. M., Oliveira, R. J. S., Oliveira, V. N., Beletti, M. E. and Espindola, F. S. (2013) Neuroprotective effects of *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk (Sapotaceae) extracto n the brains of rats with streptozotocin-induced diabets. *Metabolism Brain Disease*, 28: 411-419.

Couceiro, S., Baptista, S., Franca, I., Gonçalves, L., Vieira, M. L. and Collares-Pereira, M. (2003) Cultura vs PCR: Que apoio ao diagnóstico de Borreliose de Lyme? *Acta Reumatológica Portuguesa*, 28 (2): 77-82.

Cutler, S. J. (2015) Relapsing Fever *Borreliae* – A Global Review. *Clinics in Laboratory Medicine*, 35 (4): 847-865.

Duarte-Almeida, J., Negri, G., Salatina, A. (2004) Volatile oils in leaves of *Bauhinia*

(Fabaceae Caesalpinioideae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 32: 747-753.

Dunnett, C. W. (1955) A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *Journal of the American Statistical Association*, 50(272): 1096-1121.

EUCALB, (2012). *Biology: The Tick: Introduction*. [online] Disponível em: <http://www.eucalb.com/> [Acedido em 13- 07-2016].

Franca, I., Santos, L., Mesquita, T., Collares-Pereira, M., Baptista, S., Vieira, L., Viana, I., Vale, E. and Prates, C. (2005) Lyme borreliosis in Portugal caused by *Borrelia lusitaniae*? Clinical report on the first patient with a positive skin isolate. *The Middle European Journal of Medicine*, 117 (11-12): 429-432.

Franke, J., Hildebrandt, A. and Dorn, W. (2013) Exploring gaps in our knowledge on Lyme borreliosis spirochaetes – Updates on complex heterogeneity, ecology, and pathogenicity. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 4: 11-25.

Goc, A., Niedzwiecki A. and Rath, M. (2015) *In vitro* evaluation of antibacterial activity of phytochemicals and micronutrients against *Borrelia burgdorferi* and *Borrelia garinii*. *Journal of Applied Microbiology*, 119: 1561-1572.

Gouveia, N. M., Albuquerque, C. L., Espindola, L. S. and Espindola, F. S. (2013) Pouteria ramiflora extract inhibits salivar amylotic activity and decreases glycemic level in mice. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 85 (3): 1141-1148.

Guimarães, D. O., Momesso, L. S. and Pupo, M. T. (2010) Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, 33 (3): 667-679.

Holetz, F. B., Pessini, G. L., Sanches, N. R., Cortez, D. A. G., Nakamura, C. V. and Filho, B. P. D. (2002) Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infections disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97 (7): 1027-1031.

- Hunfeld, K. P. and Brade, V. (2006) Antimicrobial Susceptibility of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: What we know, what we don't know, and what need to know. *The Middle European Journal of Medicine*, 118 (21-22): 659-668.
- Iwu, M. M., Duncan, A. R. and Okunji, C. O. (1999) New antimicrobials of plant origin. In Janick, J. (1999). **Prospectives on new crops and new uses**. Alexandria,VA, ASHS Press, 457-462.
- Karami, A., (2012). Molecular Biology of *Borrelia burgdorferi*. In Karimi, A., **Lyme Disease**. Rijeca, Croácia: InTech, pp. 1-26.
- Klink, C. A. And Machado, R. B. (2005) A conservação do Cerrado Brasileiro. *Megadiversidade*, 1 (1): 147-155.
- Krupka, M., Raska, M., Belakova, J., Horynova, M., Novotny, R. and Weigl, E. (2007) Biological aspects of Lyme Disease Spirochetes: Unique bacteria of *Borrelia burgdorferi* species group. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Polachy, Olomouc, Czech Republic*, 151 (2): 175-186.
- Levin, J. M., Nelson, J. A., Segreti, J., Harrison B., Benson, C. A. and Strle, F. (1993) In vitro susceptibility of *Borrelia burgdorferi* to 11 antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37 (7): 1444-1446.
- Liebold, T., Straubinger, R. K. and Rauwald, H. W. (2011) Growth inhibiting activity of lipophilic extracts from *Dipsacus sylvestris* Huds. Roots against *Borrelia burgdorferi* s.s. *in vitro*. *Pharmazie*, 66: 628-630.
- Lima, T. B. (2007) Caracterização fitoquímica da cagaita (*Eugenia dysenterica*, DC) para compostos laxativos e antidiarreicos. Tese de mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia. Universidade Católica de Brasília, Brasília. 84 pp.
- Maciel, M. A. M., Pinto, A. C., Veiga Jr., V. F., Grynberg, N. F. and Echevarria, A. (2002) Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, 25 (3): 429-438.
- Marques, A. R. (2010) Lyme disease: A review. *Current Allergy and Asthma Reports*, 10: 13-20.

- Martins, N., Barros, L., Henriques, M. and Silva, S. (2015) Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species. *Industrial Crops and Products*, 74: 648-670.
- Miranda, G. S., Santana, G. S., Machado, B. B., Coelho, F. P. and Carvalho, C. A. (2013) Atividade antibacteriana *in vitro* de quatro espécies vegetais em diferentes graduações alcoólicas. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 15 (1): 104-111.
- Monteiro, M. H. A., Neves, L. J. and Andreato, R. H. P. (2007 a) Levantamento e distribuição das espécies de *Pouteria* Aubl. (Sapotaceae) do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências*, 5 (2): 369-371.
- Monteiro, M. H. A., Neves, L. J. and Andreato, R. H. P. (2007 b) Taxonomia e anatomia das espécies de *Pouteria* Aublet (Sapotaceae) do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Botânica*, 58: 7-118.
- Movila, A., Toderas, I., Dubinina, H. V., Uspenskaia, I. and Alekseev, A. N. (2012). Zoonotic Peculiarities of *Borrelia burgdorferi* s.l.: Vectors Competence and Vertebrate Host Specificity,. In Karami, A., **Lyme Disease**, Rijeca, Croácia: InTech, pp. 27-54.
- National Institute of Allergy and Infectious Disease (NIAID), (2008). *Lyme Disease: Finding the cause of Lyme Disease*. [online] Disponível em: <http://www.niaid.nih.gov/topics/lymeDisease/Pages/cause.aspx> [Acedido em 24-02-2016].
- National Institute of Allergy and Infectious Disease (NIAID), (2015). *Lyme Disease: A history of Lyme disease, symptoms, diagnosis, treatment, and prevention*. [online] Disponível em: <http://www.niaid.nih.gov/topics/lymedisease/Pages/History.aspx> [Acedido em 24-02-2016].
- Nogueira, L. G. (2012) Avaliação do potencial antimicrobiano de *Pouteria* spp. e de triterpenos quinonametídeos com enfoque no *Helicobacter pylori*. Tese de doutoramento em Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual Paulista “Lúlio de Mesquita Fialho”, Araraquara, São Paulo, Brasil. 107pp.
- O’Connell, S. (2014) Lyme borreliosis. *Medicine*, 42: 14-17.

- Pal, U., Yang, X., Chen, M., Bockenstedt, L. K., Anderson, J. F., Flavell, R. A., Norgard, M. V. and Fikrig, E. (2004) OspC facilitates *Borrelia burgdorferi* invasion of *Ixodes scapularis* salivary glands *The Journal of Clinical Investigation*, 113(2): 220-230.
- Planeta Biologia, (2015). *Os Principais biomas Brasileiros resumo*. [online] Disponível em: <http://planetabiologia.com/os-principais-biomas-brasileiros-resumo/> [Acedido em: 03-08-2016].
- Portalaction, (2016). 3.5 – teste de Dunnett – ANOVA. [online] Disponível em: <http://www.portalaction.com.br/anova/35-teste-de-dunnett> [Acedido em: 21-09-2016].
- Prado, L. C. S., Silva, D. B., Oliveira-Silva, G. L., Hiraki, K. R. N., Canabrava, H. A. N. and Bispo-da-Silva, L. B. (2014) The Gastroprotective effects of *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae) leaf extract: The possible role of condensed tannins. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 37 (5): 722-730.
- Queiroz, C. A. C. and Carneiro, C. E. (2011) Estudos Taxonômicos de *Pouteria Aublet* (Sapotaceae) para o Estado de Bahia. Seminário de Iniciação Científica. Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, Brasil. 4pp.
- Ratter, J. A., Ribeiro, J. F. and Bridgewater, S. (1997) The Brazilian Cerrado vegetation and threats to its Biodiversity. *Annals of Botany*, 80: 223-230.
- Rizolli, A., Hauffe, H. C., Carpi, G., Vourc'h, G. I., Neteler, M. and Rosà, R. (2011) Lyme borreliosis in Europe. *Eurosurveillance*, 16: 2-9.
- Rodrigues, V. E. G. and Carvalho, D. A. (2001) Levantamento etnobotânico das plantas medicinais no domínio do Cerrado na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. *Ciência e Agrotecnologia*, 25 (1): 102-123.
- Romagnolo, M. C. and Souza, M. C. (2006) O género *Eugenia* L. (Myrtaceae) na planície de alagável do Alto Rio Paraná, Estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 20 (3): 529-548.



- Rosa, P. A., Tilly, K. and Stewart, P. E. (2005) The Burgeoning molecular genetics of Lyme disease spirochaete. *Nature Reviews, Microbiology*, 3(2): 129-143.
- Ruzic-Sabljić, E. and Cesar, T. (2016) Borrelia genotyping in Lyme Disease. *The Open Dermatology Journal*, 10 (Suppl 1: M2): 6-14.
- Santos, M. and Ribeiro-Rodrigues, R. (2010) Lyme Borreliosis. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 85 (6): 930-938.
- Schwarz, S., Silley, P., Simjee, S., Woodford, N., Van Duijkeren, E., Johnson, A. P. and Gaastra, W. (2010) Editorial: Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65 (4): 601-604.
- Scorzoni, L., Benaducci, T., Almeida, A. M. F., Silva, D. H. S., Bolzani, V. S. and Gianinni, M. J. S. M. (2007) The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp and *Cryptococcus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38 (3): 391-397.
- Sehgal, V. N. and Khurana, A. (2015) Lyme disease/borreliosis as a systemic disease. *Clinics in Dermatology*, 33: 542-550.
- Silva, R. S. M., Chaves, L. J. and Naves, R. V. (2001) Caracterização de frutos e árvores de Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) no Sudeste do Estado de Goiás, Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 23 (2): 330-33.
- Silva, C. A. M., Simeoni, L. A. and Silveira, D. (2008) Genus Pouteria: Chemistry and biological activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19 (2A): 501-509.
- Soares, C. O., Ishikawa, M. M., Fonseca, A. H. and Yoshinari, N. H. (2000) Borrelioses, agentes e vetores. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 20 (1): 1-19.
- Souza, P. M., Sales, P. M., Simeoni, L. A., Silva, E. C., Silveira, D. and Magalhães, P. O. (2012 a) Inhibitory activity of  $\alpha$  – amylase and  $\alpha$  – glucosidase by plant extracts from the Brazilian Cerrado. *Planta Medica*, 78: 393-399.

- Souza, P. M., Elias, S. T., Simeoni, L. A., Paula, J. E., Sueli, M. G., Guerra, E. N. S., Fonseca, Y. M., Silva, E. C., Silveira, D. and Magalhães, P. O. (2012 b) Plants from Brazilian Cerrado with potent tyrosinase inhibitory activity. *PLOS ONE*, 7 (11): 1-7.
- Stanek, G. and Strle, F. (2003) Lyme borreliosis. *The Lancet*, 362: 1639-1647.
- Stanek, G. and Reiter, M. (2011 a) The expanding Lyme *Borrelia* complex – clinical significance of genomic species? *Clinical Microbiology and Infection*, 17: 487-493.
- Stanek, G, Wormser, G. P., Gray, J. and Strle F. (2011 b) Lyme borreliosis. *The Lancet*, 379: 461-473.
- Stanek, G., Fingerle, V., Hunfeld, K. P., Jaulhac, B., Kaiser, R., Krause, A., Kristoferitsh, W., O'Connell, S., Ornstein, K., Strle, F. and Gray, J. (2011 c) Lyme borreliosis: Clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 17 (1): 69-79.
- Steere, A. C., Grodzicki, R. I., Kornblatt, A. N., Craft, J. E., Barbour, A. G., Burgdorfer, W., Schmid, G. P., Johnson, E. and Malawista, S. E. (1983) The spirochetal etiology of Lyme disease. *The New England Journal of Medicine*, 308 (13): 733-740.
- Stefanello, M. E. A., Pascoal, A. C. R. F. and Salvador, M. J. (2011) Essential oils from neotropical Myrtaceae: Chemical diversity and biological properties. *Chemistry & Biodiversity*, 8: 73-94.
- StrainInfo (2006). *Int J Syst Evol Microbiol* 56 (4), 873-881,2006. [online] Disponível em:<http://www.straininfo.net/publicationPassport.action?id=87577&sort=description&dir=asc> [Acedido em 28-09-2016].
- Tugwell, P., Dennis, D. T., Weistein, A., Wells, G., Shea, B., Nichol, G., Hayward, R., Baker, P. and Steere, A. C. (1997) Laboratory evaluation in the diagnosis of Lyme Disease. *Annal of Internal Medicine*, 127 (12): 1109-1123.
- Veiga Jr., F. V., Pinto, A. C. and Maciel, M. A. M. (2005) Plantas medicinais cura segura? *Química Nova*, 28 (3): 519-528.

- Veinovic, G., Filipic, B. and Stankovic, J. (2013) Isolation, cultivation, and *in vitro* susceptibility testing of *Borrelia Burgdorferi* sensu lato: A Review. *Archives of Biological Sciences*, 65 (2): 533-547.
- Vieira, S. C. H., Sólón, S., Vieira, M. C. and Zárte, N. (2008) Levantamento de fitoterápicos manipulados em farmácias magistrais de Dourados – MS. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20 (1): 28-34.
- Vieira, P. M., Veronezi, E., Silva, C. R. And Chen-Chen, L. (2012) Detection of genotoxic, citotoxic, and protective activities of *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae) in mice. *Journal of Medicinal Food*, 15 (6): 563-567.
- Vila Verde, G. M., Paula, J.R. and Caneiro, D. M. (2003) Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do Cerrado utilizadas pela população de Mossâmedes (GO). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 13: 64-66.
- Wormser, G. P., Dattwyler, R. J., Shapiro, E. D., Halperin, J. J., Steere, A. C., Klempner, M. S., Krause, P. J., Bakken, J. S., Strle, F., Stanek, G., Bockenstedt, L., Fish, D., Dumler, J. S. and Nadelman, R. B. (2006) The clinical assessment, treatment, and prevention of Lyme Disease, human granulocytic anaplasmosis, and babesiosis: clinical practice guidelines by the infectious diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 43: 1089-1134.

## **VI - ANEXOS**

## VI – ANEXOS

### ANEXO 1

#### Protocolo experimental – Manufatura do meio BSK líquido (*in house*)

##### a) Meio base

##### Reagentes e equipamento

- 6g HEPES (N-2-hydroxyeth-N-2-ethanesulfonic acid)
- 5g Neopeptona
- 0,7g Ácido cítrico dihidratado
- 5g Glucose
- 2g Bicarbonato de Sódio ( $\text{NaHCO}_3$ )
- 2,5g Extrato de levedura
- 0,8g Piruvato de sódio
- 0,4g N-acetilglucosamina
- 50g Albumina bovina séria, Fração V
- 900ml de Água destilada
- 1 Magneto
- Agitador magnético
- Balança
- Balão de 2L

##### Procedimento

1 – Adicionar, sequencialmente, todos os reagentes a 900ml de água destilada e dissolver totalmente, com agitação magnética de 2 a 3 horas;

##### b) Solução de Gelatina

##### Reagentes e equipamentos

- 14g Gelatina
- 200ml Água destilada
- 1 copo Schott 500ml
- Balança

- Autoclave

### **Procedimento**

1 – Adicionar 14g de Gelatina a 200ml de água destilada e autoclavar a 121 °C durante 20 minutos;

### **c) Meio base (continuação)**

#### **Reagentes e equipamentos**

- 100ml CMRL, 1066 sem L- Glutamina
- NaOH (solução saturada)
- 2 tubos de meio de cultura nutritivo
- Bomba de Vácuo
- Solução de gelatina (previamente preparada)
- 60ml Soro de Coelho estéril e inativado
- Tubos Falcon 50ml estéreis
- Câmara de Fluxo Laminar

#### **Preparação**

- 1 – Utilizando a câmara de fluxo laminar, adicionar 100ml de CMRL à solução de meio base preparada na alínea a);
- 2 – Ajustar o pH para  $7,6 \pm 0,3$ , utilizando a solução saturada de NaOH;
- 3 – Utilizar a bomba de vácuo com filtro a 0,22  $\mu$ m para esterilizar a solução de meio base;
- 4 – Retirar algumas gotas da solução meio base e adicionar a um tudo de meio nutritivo, incubar a 37°C durante 48h para verificar a esterilidade;
- 5 – Adicionar à solução anterior a solução de gelatina preparada na alínea b);
- 6 – Adicionar 60ml de soro de coelho;
- 7 – Distribuir em tubos Falcon de 50ml estéreis, mantendo a agitação magnética em toda a distribuição;
- 8 - Retirar algumas gotas da solução e adicionar a um tudo de meio nutritivo, incubar a 37°C durante 48h para verificar esterilidade;